

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A
Direktor Univ.- Prof. Dr. Markus M. Lerch
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema: Assoziation zwischen NOD2 Mutationen und dem Verlauf der akuten Pankreatitis

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2011

vorgelegt von:
Richard Bartels
geb. am: 28.10.1978
in: Wiesbaden

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Lerch

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Halangk

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum der Klinik und Poliklinik für Kinderchirurgie

Tag der Disputation: 22.02.2012

Inhaltsverzeichnis

1. Das Pankreas	6
2. Pankreatitis	7
2.1 Einteilung, Inzidenz und Mortalität	7
2.2. Ätiologie	7
2.2.1. Mutationen und Pankreatitis	9
2.2.2. Pathophysiologie der akuten Pankreatitis	11
2.2.3. Nekrose und Apoptose	12
2.2.4. Entzündungsreaktion	12
2.2.4.1. NF κ B	12
2.2.4.2. TNF α und IL1 β	13
2.2.4.3. IL-6	13
2.2.4.4. IL-10	13
2.2.4.5. PAF	13
2.2.4.6. ICAM-1	14
2.2.4.7. Chemokine	14
2.2.4.8. Substanz P	14
2.3. Klinik	15
2.3.1. Klinik der akuten Pankreatitis	15
2.3.2. Auftreten von SIRS und MOD bei der akuten Pankreatitis	16
2.3.3. Mukosabarriere und akute Pankreatitis	17
2.4. Diagnostik der akuten Pankreatitis und Prognosefaktoren	17
2.5. Therapie der akuten Pankreatitis	19
3. Immunabwehrmechanismen	19
3.1. Generelle Prinzipien	19
3.2. NOD – nucleotide-binding oligomerization domain	22
3.2.1. NOD2 Mutationen und die Bedeutung bei Morbus Crohn	23
4. Ziele der Untersuchung	26
5. Material und Methoden	27
5.1. Studienpatienten	27
5.1.1. Magdeburg Untersuchungsgruppe	27
5.1.2. Greifswald Untersuchungsgruppe	27
5.1.3. Greifswald Kontrollgruppe	27
5.1.4. Definiton der Studien-Kohorten	27
5.2. Methoden	28
5.2.1. DNA Extraktion	28

5.2.2. Real-Time PCR	30
5.2.3. PCR und Sequenzierung	32
5.2.3.1. PCR	32
5.2.3.2. Sequenzierung	34
5.3. Statistische Verfahren	37
6. Ergebnisse	38
6.1. Chromatogramme	38
6.2. Häufigkeit der NOD2 Gen Mutationen (SNP 8, SNP 12, SNP 13)	41
6.3. Statistische Auswertung	43
7. Diskussion	48
7.1. Auswertung der Daten	48
7.2. Möglichkeit der Assoziation zwischen NOD2 Mutationen und dem Verlauf der akuten Pankreatitis	50
7.3 Relevanz der Fragestellung	52
8. Zusammenfassung	54
9. Literaturverzeichnis	55

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der pro- und antiinflammatorischen Mediatoren.	15
Tab. 2: Kriterien des SIRS	16
Tab. 3: Materialien der rt-PCR.	31
Tab. 4: Primer der rt-PCR.	31
Tab. 5: Sonden der rt-PCR.	31
Tab. 6: Zyklen der rt-PCR.	31
Tab. 7: Materialien der PCR.	33
Tab. 8: Zyklen der PCR.	33
Tab. 9: Verwendete PCR Primer.	33
Tab. 10: Sequenzierungsmaterialien.	34
Tab. 11: Zyklen der Sequenzierung.	35
Tab. 12: Zusammensetzung des Auftragepuffers.	35
Tab. 13: Material des Sequenziergels.	35
Tab. 14: Neue Sequenzierungsprimer.	36
Tab. 15: Häufigkeit der NOD2 Mutationen in den untersuchten Patientengruppen: wt: Wildtyp, M Mutiertes Allel, pM Häufigkeit von mutierten Allelen.	41
Tab. 16: Summe aller Mutationen in den Patientengruppe	42

Tab. 17: Ergebnisse der Assoziationstests der Patientenkohorten gegen die Kontrollkohorte	43
Tab 18: Ergebnisse der Assoziationstests unterschiedlicher Patientenkohorten	44
Tab. 19: Ergebnisse der Assoziationstests der Patientenkohorten gegen die Kontrollkohorte unter Summation der einzelnen SNP.	44
Tab 20: Ergebnisse der Assoziationstests unterschiedlicher Patientenkohorten unter Summation der einzelnen SNP.	44

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zeitlicher Verlauf der Pankreatitis nach Andersson R, Andersson B, 2007 [82].	17
Abb. 2: Übersicht der TLR Rezeptoren mit Liganden nach E. Cario 2005 [156].	20
Abb. 3: Schematische Zeichnung des NOD2 Signalwegs (nach Strober et al 2006).	22
Abb 4: Schematische Struktur des NOD2 Proteins mit den 3 häufigsten Mutationen.	23
Abb. 5: Schematische Darstellung des Einflusses von NOD2 Mutationen auf α -Defensin Produktion	24
Abb. 6: SNP8 R702W heterozygote Mutation.	38
Abb. 7: SNP8 R702W homozygote Mutation.	39
Abb. 8: SNP12 R910I heterozygote Mutation.	39
Abb. 9: SNP12 wildtyp.	39
Abb. 10: SNP13 3020InsC heterozygote Mutation.	40
Abb. 11: SNP13 wildtyp.	40

Einleitung

1. Das Pankreas

Das Pankreas (Bauchspeicheldrüse) liegt retroperitoneal in Höhe des 2. Lendenwirbels hinter dem Magen. Es gliedert sich in Kopf (Caput), Körper (Corpus) und Schwanz (Cauda). Der Kopf liegt im duodenalen C und der Schwanz im Bereich des Milzhilus. Sein Gewicht beträgt zwischen 70 und 120g. Das Pankreas wird durchzogen vom Pankreasgang (Ductus pancreaticus), der in den Dünndarm über die Papilla Vateri mündet. Es ist von einer zarten Kapsel aus kollagenem Bindegewebe umgeben. Die Blutversorgung erfolgt durch zahlreiche kleineren Äste der Arteria mesenterica superior und dem Truncus coeliacus (Art. splenica, Art. gastroduodenalis).

Das Pankreas besteht aus einem exokrinen und einem endokrinen System. Der exokrine Anteil besteht aus Azinus- und Gangzellen. Die Azinuszellen bilden eine azinöse, rein seröse Drüse, die pro Tag 1,5-3 Liter Sekret produziert und über das Pankreasgangsystem ins Duodenum abgibt. Sie stellen 90 % der Zellmasse des Pankreas dar und sezernieren die für die Verdauung von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen benötigten Enzyme. Dabei werden einzig Amylase und Lipase als aktive Enzyme sezerniert, weitere Enzyme, wie zum Beispiel Chymotrypsin, Trypsin und Elastase, werden als inaktive Vorstufen (Zymogene) produziert und später im Darm durch Enterokinasen der duodenalen Mukosa aktiviert. Auf diese Weise schützt sich das Pankreas vor dem Selbstverdau durch sein eigenes Sekret. Durch vorzeitige Aktivierung der Pankreasenzyme kann eine akute Pankreatitis entstehen. Eine weitere Form von Drüsenzellen im Pankreas sind die Gang-Zellen. Diese sezernieren vorwiegend Wasser und Bicarbonat. Hierdurch wird die Magensäure im Darm neutralisiert, die Viskosität des Sekrets bestimmt und auch der pH Wert des Pankreassekretes reguliert. Langerhans-Zellen bilden den endokrinen Teil des Pankreas. Die vor allem in den Schwanzabschnitten lokalisiert sind und sich aus den A-, B-, D-, und den PP-Zellen zusammensetzen. Die B-Zellen überwiegen unter den Insel-Zellen (80%) und bilden Insulin. Die A-Zellen produzieren Glukagon, die D-Zellen Somatostatin, welches die Insulin- und die Glukagonfreisetzung hemmt. In den PP-Zellen wird das pankreatische Polypeptid gebildet, welches die exokrine Sekretion hemmt. Die Langerhans-Inseln stehen in direktem Zellkontakt mit dem exokrinen Gewebe, da sie durch keine Membran abgetrennt werden. Außerdem stehen die Insel-Zellen mit dem exokrinen Gewebe durch kapillare Anastomosen in Verbindung.

2. Pankreatitis

2.1 Einteilung, Inzidenz und Mortalität

Die entzündlichen Erkrankungen des Pankreas werden aufgrund klinischer Kriterien in akute und chronische Formen unterschieden. Das klinische Bild der akuten Pankreatitis reicht von einer meist selbstlimitierenden ödematösen Form mit anschließender völliger Genesung, bis zur nekrotisierenden Pankreatitis bei der häufig ein systemic inflammatory response syndrome (SIRS) auftritt, oftmals mit Folge eines Multiorganversagens .

Die Inzidenz der akuten Pankreatitis unterscheidet sich weltweit beträchtlich und ist abhängig von Faktoren, wie zum Beispiel Alkoholkonsum oder der Häufigkeit von Gallensteinen in der jeweiligen Bevölkerungsgruppe. Für Norddeutschland wird eine Inzidenz von 19,7 auf 100 000 Einwohner angegeben [1], in Kalifornien beträgt die Inzidenz 33,2 bis 43,8 auf 100 000 Einwohner [2] und in Finnland etwa 74 auf 100 000 Einwohner [3]. Viele Untersuchungen zur Inzidenz der Pankreatitis belegen, dass akute Pankreatitiden zunehmend häufiger auftreten. Hierzu tragen aber vor allem die verbesserten Methoden zur Pankreatitisdiagnostik bei [4, 5]. Zur Mortalität der Erkrankung bei zunehmender Inzidenz gibt es unterschiedliche Ergebnisse. In einer früheren Untersuchung war ein Rückgang der Mortalität zu beobachten [6]. Aktuellere Publikationen berichten jedoch [2, 4] über eine ähnliche Mortalität der akuten Pankreatitis während ihres Untersuchungszeitraumes.

Welche Faktoren zu welchem Zeitpunkt den Verlauf der Pankreatitis beeinflussen ist nicht bekannt. Es gibt zahlreiche Diagnose Methoden um die Mortalität der akuten Pankreatitis nach den ersten 48h abzuschätzen: Z.B. den APACHE II Score, den Ranson Score und die Imrie Kriterien. Eine zuverlässige Aussage über Schweregrad und Verlauf der Pankreatitis lässt sich bisher jedoch mit hoher Spezifität und Sensitivität nicht treffen.

2.2. Ätiologie

Die auslösenden Faktoren einer akuten Pankreatitis sind vielfältig und die pathophysiologischen Mechanismen, über die diese Faktoren zur Erkrankung führen sind in ihren molekularen Details bisher meist nur ungenügend verstanden.

Ein pathophysiologisches Modell der Pankreatitis basiert auf der Autodigestion des Organs durch proteolytische Enzyme, die vorzeitig und intrazellulär im Pankreas aktiviert werden. Wenn die Trypsinogenaktivierung in hohem Maße bereits intra-azinär stattfindet und lokale Gegenregulationsmechanismen nicht erfolgreich sind, werden weitere Verdauungsenzyme

und Enzymkaskaden aktiviert. Die Folge ist die Selbstverdauung des Pankreas und des peripankreatischen Gewebes.

Gallenwegserkrankungen (30-50%) und Ethanol (30-40%) sind die häufigsten Auslöser der akuten Pankreatitis. Dabei ist unklar, ob Alkoholiker mit Pankreatitis eine besondere Subpopulation mit weiterem Prädispositionsfaktor darstellen. Die meisten Alkoholiker entwickeln keine Pankreatitis und auch im Tiermodell wird durch die alleinige Gabe von Ethanol keine Pankreatitis ausgelöst [7]. Gegenwärtig wird intensiv an den pathophysiologischen Mechanismen geforscht, durch die Ethanol eine Pankreatitis verursachen oder begünstigen kann. So wird im Pankreas Ethanol vorwiegend nicht zu Acetaldehyd, sondern unter der vorübergehenden Bildung von Fatty Acid Ethyl Esters (FAEE) abgebaut [8, 9]. FAEE Plasmaspiegel, wie sie beim Menschen vorkommen, können bei der Ratte Pankreasschäden verursachen [10]. Der Grund hierfür ist möglicherweise, dass FAEE dauerhaft hohe intrazelluläre Kalziumspiegel hervorrufen können [11]. Ein erhöhter intrazellulärer Kalziumspiegel begünstigt die Trypsinogenaktivierung und kann einen ersten Schritt Richtung Pankreatitis darstellen [12, 13]. Es konnte bereits ein Genpolymorphismus im Gen der Carboxylester Lipase, welche die Synthese von FAEE aus Ethanol katalysiert, festgestellt werden, der mit der Alkohol induzierten Pankreatitis assoziiert ist [14]. Exzessiver Alkoholkonsum ist ein Risikofaktor für das Auftreten von Nekrosen im Pankreas [15]. Neben dem Zelltod durch Nekrose kann der Zelltod auch durch Apoptose eintreten. Beim Zelltod durch Apoptose spielen Caspasen eine wichtige Rolle. Benachbartes Gewebe wird hierbei weniger geschädigt. Der Zelltod durch Apoptose geht mit einer geringeren Entzündungsreaktion einher. Ethanol inhibiert im Rattenmodell Caspasen und könnte so die Apoptose im pankreatischen Gewebe verhindern und die Nekrose fördern [16, 17]. Die Aktivität und Expression von Cathepsin B wird im Rattenmodell durch Ethanol fütterung gefördert [16]. Cathepsin B wiederum fördert die intrapancreatische Trypsinogenaktivierung und spielt daher eine Rolle beim Ausbruch einer akuten Pankreatitis [18]. Somit könnte Ethanol auch auf diesem Weg zur Pankreatitis führen. Ebenso ist Ethanol bei der Fibrosierung des Pankreas involviert. Ethanol und Acetaldehyd aktivieren pankreatische Sternzellen, welchen eine Schlüsselrolle bei der Fibrosierung des Pankreas im Rahmen der chronischen Pankreatitis zukommt [19, 20].

Die Passage von Gallensteinen durch den Ductus choledochus und die Papilla Vateri kann eine akute biliäre Pankreatitis auslösen [21]. Die genauen pathophysiologischen Vorgänge, die zum Entstehen einer solchen Pankreatitis führen, werden kontrovers diskutiert. Schon 1901 begründete Opie die sogenannte „common channel“ Theorie. Er beschrieb, dass es bei einem Verschluss distal des Zusammenflusses von Ductus choledochus

und Ductus wirsungianus zum Reflux von Gallenflüssigkeit in das Pankreas kommt und so eine Pankreatitis ausgelöst wird [22]. Lerch et al zeigten 1993, bei Versuchen mit Opossums, dass es auch ohne Reflux von Gallenflüssigkeit in das Pankreas, bei alleinigem Stau des Pankreasgangs, zu einer akuten Pankreatitis kommt [23]. So kann bei der Passage von Gallensteinen in das Duodenum gelegentlich eine Inkarzeration im ampullären Bereich auftreten. Die resultierende Druckerhöhung im Pankreasgang mit nachfolgender Schädigung der Azinuszellen ist dann der Ausgangspunkt der auftretenden Pankreatitis [24].

Als seltenere Ursache kann auch eine Hyperkalzämie eine akute Pankreatitis auslösen [25]. Studien weisen darauf hin, dass durch Hyperkalzämie eine überphysiologische Trypsinogenaktivierung stattfindet [26,27].

2.2.1. Mutationen und Pankreatitis

Neben den bisher genannten Faktoren spielt auch die genetische Prädisposition eine wichtige Rolle bei der Entstehung oder der Progression einer Pankreatitis. Erkrankungen des Pankreas können durch Mutationen verursacht, oder zumindest begünstigt werden.

Mutationen des kationischen Trypsinogen-Gens (PRSS1) oder des Serin Protease Inhibitor Kazal Typ 1 (SPINK1) wurden als Risikofaktoren der chronischen Pankreatitis identifiziert. [28, 29].

Pankreatitiden, welche ursächlich im Zusammenhang mit Mutationen entstehen, werden als hereditäre Pankreatitiden bezeichnet. Sie sind durch in der Kindheit rezidivierend auftretende akute Pankreatitisschübe mit Übergang in eine chronische Pankreatitis charakterisiert.

In beiden Genen wurden in den letzten Jahren verschiedene Sequenzvariationen entdeckt. Die häufigste Mutation des PRSS1-Gens ist die 1996 von D. Whitcomb erstmalig beschriebene R122H-Mutation. Man nimmt, aufgrund von funktionellen Untersuchungen an rekombinantem Trypsinogen, an, dass diese Mutation aktiviertes Trypsin gegenüber hydrolytischer Inaktivierung stabilisiert [30]. Neben der erhöhten Stabilität des Trypsins durch die R122H-Mutation, konnte auch eine gesteigerte Autoaktivierung gezeigt werden [31]. Für weitere Mutationen des kationischen Trypsinogen-Gens (N29I-Mutation und N29T-Mutation) konnte ebenfalls eine erhöhte Autoaktivierung nachgewiesen werden. Es wurde postuliert, dass die Autoaktivierung des Trypsinogen der pathogenetische Mechanismus ist, aufgrund dessen die Assoziation zwischen den PRSS1-Mutationen und der hereditären Pankreatitis zustande kommt [32]. Die häufigste Mutation des SPINK1-Gens ist die N34S-Mutation. Man nimmt an, dass der Serin Protease Inhibitor Kazal Typ 1 ein Inhibitor der intrapankreatischen Trypsinaktivität ist. "Loss-of Function" Mutationen im SPINK1-Gen würden so zu einer stärkeren Aktivität des Trypsin im Pankreas und auf diesem Wege zur

Pankreatitis führen. Für die SPINK1 N34S Mutation konnte experimentell keine verminderte inhibitorische Aktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte in transgenen SPINK1 Mäusen die Cerulein induzierte Pankreatitis durch eine erhöhte SPINK1 Aktivität abgeschwächt werden [33]. Zahlreiche weitere Mutationen wurden bisher entdeckt [34]. Eine aktuelle Zusammenstellung findet sich auf einer speziellen Internetseite der Universität Leipzig [35].

Auch für Mutationen des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gens konnte 1998 ein Zusammenhang mit der Pankreatitis gezeigt werden [36, 37]. Das CFTR Gen kodiert einen Chloridkanal, der die Flüssigkeits- und Elektrolytsekretion z.B. im Respirationstrakt oder den Gangzellen des Pankreasgangs beeinflusst. Mutationen des CFTR Gens, und damit eine gestörte CFTR Funktion, gehen sowohl mit zystischer Fibrose, Fertilitätsstörungen als auch Pankreatitiden einher. Die Assoziation von Mutationen dieses Gens mit unterschiedlichen Erkrankungen scheint mit der verbliebenen Kanal-Aktivität zusammenzuhängen. Während schwere Mutationen mit totalem Aktivitätsverlust eher das Krankheitsbild der zystischen Fibrose verursachen, sind mildere Mutationen mit geringer Restaktivität eher mit Pankreatitiden assoziiert. Die Pankreatitisentstehung könnte mit einer herabgesetzten Fähigkeit Verdauungsenzyme durch den Pankreasgang auszuscheiden zusammenhängen.

Neben Mutationen, welche die Entstehung einer Pankreatitis begünstigen, wurde mittlerweile auch eine protektive Mutation entdeckt, die seltener bei Patienten mit chronischer Pankreatitis auftaucht, als in der Allgemeinbevölkerung. Es handelt sich dabei um eine G191R Mutation im anionischen Trypsinogen Gen (PRSS2). Bei der Funktionsanalyse wurde gezeigt, dass das G191R anionische Trypsinogen, im Vergleich zum Wildtyp des anionischen Trypsinogens, wesentlich mehr zur Autodegeneration neigt [38].

Weitere Ursachen der Pankreatitis sind Arzneimittelnebenwirkungen, Toxine, Infektionserkrankungen, Stoffwechselerkrankungen, medizinischen Eingriffe oder Traumata. Oftmals bleibt die Ätiologie der akuten Pankreatitis ungeklärt, dann spricht man von einer idiopathischen Pankreatitis.

2.2.2. Pathophysiologie der akuten Pankreatitis

Die genauen pathophysiologischen Vorgänge, die zu einer akuten Pankreatitis führen, sind bisher noch nicht endgültig erforscht. Vermutlich hat die Pankreatitis ihren Ursprung in den Azinuszellen. Durch Schädigung der Azini kommt es zu einer Sekretionsblockade und zur Aktivierung von pankreatischen Enzymen innerhalb der Azinuszelle, besonders von Trypsinogen zu Trypsin.

Auf verschiedenen Wegen können intrazelluläre inaktive Zymogene in aktive Enzyme umgewandelt werden:

1. Autoaktivierung von Trypsinogen zu Trypsin. [39]
2. Spaltung von Trypsinogen zu Trypsin durch die lysosomale Hydrolase Cathepsin B (CTSB) [40] oder eine andere bisher nicht identifizierte Protease.
3. Verminderte Inhibierung von aktiviertem Trypsin.

Hohe intraazinäre Kalziumspiegel und niedrige intraazinäre pH-Werte fördern eine vermehrte Trypsinaktivierung, die zu einem Azinuszellschaden führen kann und somit eine akute Pankreatitis initiiert [41, 42].

Zur Inhibition von kleineren Mengen intraazinär aktiviertem Trypsin stehen mehrere Mechanismen zur Verfügung:

1. Der Serinproteaseinhibitor Kazal Typ I (SPINK1) kann bis zu 20% des Trypsins reversibel blockieren, welches unter physiologischen Bedingungen anfällt.
2. Trypsin autolytisiert sich in hohem Maße selbst.
3. Trypsinogen wird durch trypsinaktivierte trypsinähnliche Enzyme, wie Mesotrypsin oder Chymotrypsin C degradiert.
4. Unspezifische Antiproteasen im Pankreasparenchym, wie alpha-1-Antitrypsin oder alpha-2-Makroglobulin, inaktivieren Trypsin. [43]

Wenn diese Abwehrmechanismen, in Gegenwart von großen Mengen aktivierten Trypsins, nicht mehr ausreichen, aktiviert das intrapankreatische Trypsin weiteres Trypsin und andere pankreatische Enzyme wie Phospholipase, Chymotrypsin und Elastase. Ebenso werden andere Enzymkaskaden wie das Komplement-, Kallikrein-Kinin- und Fibrolytische System in Gang gesetzt. Durch diese Aktivierungskaskaden erfolgt ein sich selbst verstärkender Zellschaden mit nachfolgender Enzymaktivierung, die einen erneuten Zellschaden bewirkt. [44]

2.2.3. Nekrose und Apoptose

Im Verlauf einer akuten Pankreatitis kommt es zum Zelltod, der sowohl durch Nekrose, als auch durch Apoptose verursacht sein kann. [45]. Studien zeigen, dass unterschiedliche Arten des Zelltodes mit unterschiedlich schweren Verläufen der Pankreatitis assoziiert sind. [45,46]. Die Apoptose scheint dabei eher mit der leichteren ödematösen Pankreatitis zu assoziieren und die Verlaufsschwere zu reduzieren [47], wohingegen Nekrosen meist mit schwereren Verläufen einhergehen [48].

2.2.4. Entzündungsreaktion

Die Entzündungsreaktion bei der akuten Pankreatitis hat einen wesentlichen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung. So spielen Entzündungsmediatoren eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Immunreaktion [48,49]. Es wurde bereits 1988 vermutet, dass eine Überaktivierung des Immunsystems die Krankheitsschwere beeinflusst und die Krankheitsfolgen sowohl lokal, als auch systemisch verstärkt [50]. Proinflammatorisch wirken: Tumor Nekrose Faktor α (TNF α), Interleukin 1 β (IL1 β), Interleukin 6 (IL6), platelet activating factor (PAF), ICAM-1, Interleukin 8 (IL8), substance P und andere. Anti-inflammatorisch wirken unter anderen: Interleukin 10 (IL10), Komplement Faktor C5a, lösliche TNF Rezeptoren (sTNFR), IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1ra) und neutrale Endopeptidase (NEP). Die Expression von einigen dieser Mediatoren wird durch Nuklear Faktor κ B (NF κ B) beeinflusst.

2.2.4.1. NF κ B

NF κ B ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor. Er ist für die Beeinflussung der Transkription einer großen Anzahl von Genen verantwortlich, die eine Rolle bei Entzündungen, Gewebsschäden und Gewebeheilung spielen. [51,52] Er besteht aus mehreren Untereinheiten: NF κ B1 (p50), NF κ B2 (p52), p65 (RelA), RelB und c-Rel [53]. Die Aktivität von NF κ B wird zum Teil über das inhibitorische Protein I κ B reguliert, in dessen Gegenwart die NF κ B Aktivität niedrig ist. Wird I κ B durch I κ B Kinasen (IKK) phosphoryliert, so wird NF κ B aktiviert und gelangt so in den Zellkern und induziert die Transkription proinflammatorischer Gene [54].

Durch mehrere Tiermodelle der akuten Pankreatitis konnte eine intrapankreatische NF κ B Aktivierung nachgewiesen werden [55]. Wird im Tiermodell die Aktivierung von NF κ B zum Beispiel durch N-Acetylcystein (NAC) inhibiert, so wird die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen verringert [56]. Andere Daten belegen, dass die Inhibition von NF κ B zu erhöhtem Zellschaden führt [57]. In einer anderen Arbeit reichte die direkte

intrapankreatische NF κ B Stimulation aus, um eine Entzündungsreaktion auszulösen [58]. Die genaue Rolle von NF κ B bei der akuten Pankreatitis ist somit noch nicht endgültig geklärt.

2.2.4.2. TNF α und IL1 β

Die Spiegel von TNF α und IL1 β sind zu Beginn und im Verlauf der akuten Pankreatitis hoch. Als Gegenspieler fungieren sTNR und IL-1ra, welche die Aktivität von TNF α und IL1 β neutralisieren [59]. Tierexperimentell haben TNF α - und IL1 β -Knockout Mäuse signifikant bessere Überlebensraten als Wildtyp-Mäuse [60]. Ebenso waren die Verläufe der Pankreatitis im Tiermodell weniger schwer, wenn TNF α -Antikörper verabreicht wurden [61].

2.2.4.3. IL-6

IL-6 ist ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin, dessen Plasmaspiegel unter anderem bei Patienten mit akuter Pankreatitis erhöht ist. Die Plasmaspiegel von IL-6 korrelieren mit der Erkrankungsschwere. Bei transgenen Mäuse, die humanes IL-6 überexpressionieren und einen monoklonalen anti-IL-6 Antikörper bekamen, war das Pankreasgewicht und somit das durch die Entzündung hervorgerufene Ödem, durch die, mittels Cearulin und LPS induzierte Pankreatitis, im Vergleich zu Mäusen, die keinen IL-6 Antikörper injiziert bekamen geringer [62,63]. Die Autoren schlossen somit auf einen potentiell protektiven Effekt von IL-6 Antikörpern bei der Therapie der akuten Pankreatitis.

2.2.4.4. IL-10

IL-10 ist ein entzündungshemmendes Zytokin. In mehreren Studien konnte ein schützender Effekt von IL-10 bei der akuten Pankreatitis gezeigt werden [64, 65]. Ebenso konnten systemische Komplikationen bei Kaninchen mit nekrotisierender Pankreatitis durch Gabe von IL-10 Agonisten vermindert werden [66]. Zum Verhältnis des Plasmaspiegels von IL-10 zur Verlaufsschwere der akuten Pankreatitis beim Menschen gibt es unterschiedliche Daten [67, 68, 69]. Eine sichere Aussage über die Rolle von IL-10 bei der menschlichen Pankreatitis steht somit noch aus.

2.2.4.5. PAF

PAF ist ein proinflammatorisch wirkendes Zytokin, welches während der akuten Pankreatitis in pankreatischen Azinuszellen synthetisiert wird. Ebenso steigt die Konzentration von PAF im Pankreasgewebe während der Cerulein induzierten Pankreatitis [70]. Die Gabe eines PAF Rezeptor Antagonisten konnte im Experiment den Entzündungsschaden verringern [70]. Eine klinische Phase II Studie nährte die Hoffnung auf die mildernde Wirkung des PAF Antagonisten Lexipafant bei der akuten Pankreatitis im Menschen [71]. Diese Hoffnung konnte von einer weiteren Studie aber nicht unterstützt werden. Hier zeigte sich, dass

Lexipafant keinen Effekt auf den Verlauf der Erkrankung hatte [72]. Somit wurde die weitere Entwicklung von Lexipafant als Medikament zur kausalen Behandlung der akuten Pankreatitis verlassen [73].

2.2.4.6. ICAM-1

ICAM-1 ist ein Oberflächenprotein endothelialer Zellen, welches die Leukozytenmigration beeinflusst. Während Entzündungen wird ICAM-1 vermehrt gebildet [74]. Im Tierexperiment waren ICAM-1-Knockout Mäuse deutlich weniger von der akuten Pankreatitis und einhergehendem Lungenschaden betroffen, als Wildtyp-Mäuse [75]. Auch eine Antagonisierung von ICAM-1 hatte einen protektiven Effekt in Bezug auf Lungenschäden bei der akuten schweren Pankreatitis [76]. Somit bietet ICAM-1 einen weiteren Ansatzpunkt auf dem Weg zu einer kausalen Therapie der Pankreatitis.

2.2.4.7. Chemokine

Chemokine sind eine Gruppe von niedrig molekularen Polypeptiden, welche für die Chemotaxis von Leukozyten und weiteren inflammatorischen Zellen eine entscheidende Rolle spielen [74]. Bisher sind mehrere Gruppen mit über 50 verschiedenen Chemokinen und über 20 verschiedene Rezeptoren beschrieben worden. Für einige konnte eine Funktion bei der akuten Pankreatitis gezeigt werden. So sind die Spiegel des Ratten-Chemokins CINC, welches analog zum menschlichen GRO- α ist, während der experimentellen Pankreatitis hoch [77]. Eine Behandlung mit einem CINC Antikörper bewahrt die Ratten vor pankreatitisassoziiertem Lungenschaden [78].

2.2.4.8. Substanz P

Substanz P ist ein Neuropeptid, welches von Nervenenden in vielen Geweben freigesetzt wird. Es bindet an den Neurokinin-1 (NK1) Rezeptor und beeinflusst neben der Vermittlung von Schmerz auch Entzündungsreaktionen. Bei der experimentell induzierten Pankreatitis der Maus steigt der Spiegel von Substanz P im Pankreas. Dabei waren die Azinuszellnekrosen sowie der begleitende Lungenschaden von NK1-knockout Mäusen wesentlich geringer als bei den Wildtyp-Mäusen [79].

Mild	Schwer
<p>Antiinflammatorische Mediatoren</p> <p>NEP</p> <p>C5a</p> <p>IL-10</p> <p>sTNFR</p> <p>IL-1ra</p>	<p>Proinflammatorische Mediatoren</p> <p>IL-1</p> <p>TNFα</p> <p>IL-6</p> <p>PAF</p> <p>ICAM-1</p> <p>IL-8</p> <p>GRO-α / CINC</p> <p>MIP-1α / RANTES</p> <p>MCP-1</p> <p>Substanz P</p>
Apoptose	Nekrose

Tab. 1: Übersicht der pro- und antiinflammatorischen Mediatoren.

2.3. Klinik

2.3.1. Klinik der akuten Pankreatitis

Es gibt im Wesentlichen zwei Verlaufsformen der akuten Pankreatitis. Eine milde (ödematöse) und eine schwere (nekrotisierende) Form. Die schwere Verlaufsform der Pankreatitis wird durch das Auftreten von Organversagen, dem Zutreffen von mehr als 2 Ranson Kriterien, einen APACHE II Score > 7 oder dem Auftreten lokaler Komplikationen wie Pankreasnekrosen, Pseudozysten- oder Abszessbildung im Pankreas definiert [80].

Das Leitsymptom der akuten Pankreatitis sind abdominelle Schmerzen. Die Intensität der Schmerzen reicht von leichten erträglichen Beschwerden bis zu schweren, konstanten und nahezu unerträglichen Schmerzen. Typisch ist ein anhaltender bohrender Schmerz periumbilikal und epigastrisch, mit gürtelförmiger Ausstrahlung in den Rücken. Begleitet wird der Schmerz häufig von Übelkeit, Erbrechen, Meteorismus und Obstipation. Regelmäßig tritt eine ausgeprägte Exsikkose auf.

Während der körperlichen Untersuchung sind die Patienten meist ängstlich und unruhig. Zunächst findet sich eine eher geringe abdominelle Abwehrspannung. Ebenso sind anfangs

Zeichen der Peritonitis selten, da sich die Erkrankung zu Beginn im Retroperitoneum abspielt. Die Darmgeräusche sind vermindert oder fehlen ganz, als Zeichen der reflektorischen Paralyse einzelner Darmabschnitte oder eines paralytischen Ileus. Zum Teil schon vor einer Änderung der Darmgeräusche, ist das geblähte Abdomen der Patienten und der tympanische Klopfeschall über dem Colon transversum (Goblet-Guyot'sches Zeichen) zu bemerken. Die Schmerzen lassen sich in 20% auch im linken phrenico-costalen Winkel (Mallet-Guy'sches Zeichen) oder am Rücken, im linken costovertebralen Winkel (Mayo-Robson'sches Zeichen) lokalisieren. Häufig können subfebrile Temperaturen, Tachykardie und Hypotonie festgestellt werden. Durch Exsudation von Blut und Plasmaproteinen in den retroperitonealen Raum oder durch die erhöhte Freisetzung von Kininen mit konsekutiver Vasodilatation kann es zum Schock kommen. Bei 20-30% der Patienten kommt es zur Lungenbeteiligung mit basalen Rasselgeräuschen, Atelektasen und meist linksseitigem Pleuraerguss. Zeichen für die schwere nekrotisierende Verlaufsform sind eine schwache bläuliche Verfärbung um den Bauchnabel (Cullen's sign), als Hinweis auf ein Hämatoperineum, und blau-rot-violette oder grün-braune Hautveränderungen an den Flanken (Turner's sign), als Ausdruck eines Hämoglobinabbaus im Gewebe.

2.3.2. Auftreten von SIRS und MOD bei der akuten Pankreatitis

Die erste Phase der akuten Pankreatitis geht mit einer starken Entzündungsreaktion einher. Während dieser ersten Phase treten häufig eine überbordende Entzündungsreaktion und das systemic inflammatory response syndrome (SIRS) ein. Das SIRS ist die Folge einer überbordenden Reaktion des Immunsystems (Zytokin-Sturm), ohne dass ein Infektionserreger ursächlich ist.

Ein SIRS liegt vor, wenn 2 oder mehr Kriterien erfüllt sind:
Temperatur $>38,5^{\circ}\text{C}$ oder $<35^{\circ}\text{C}$
Puls > 90 /min
Atemfrequenz > 20 /min oder $\text{PaCO}_2 < 32\text{mmHg}$
Leukozyten $>12000/\text{mm}^3$, $<4000/\text{mm}^3$, oder $>10\%$ unreife Leukozyten

Tab. 2: Kriterien des SIRS

Bereits in dieser frühen Phase der Erkrankung kann ein multiple organ dysfunction syndrome (MODS) auftreten, in der einzelne oder mehrere Organe ihre Funktion nicht mehr ohne Intervention von außen aufrechterhalten können.

Im weiteren Verlauf der Erkrankung kann es zu einem compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) kommen, einem Zustand in dem das Immunsystem anerg gegenüber erneuten Infektionsstimuli ist [81]. Es wird vermutet, dass in dieser Phase der Patient anfälliger gegenüber einer bakteriellen Translokation oder einem chirurgischen Trauma ist. Auch in dieser zweiten Phase können MODS sowie Sepsis auftreten.

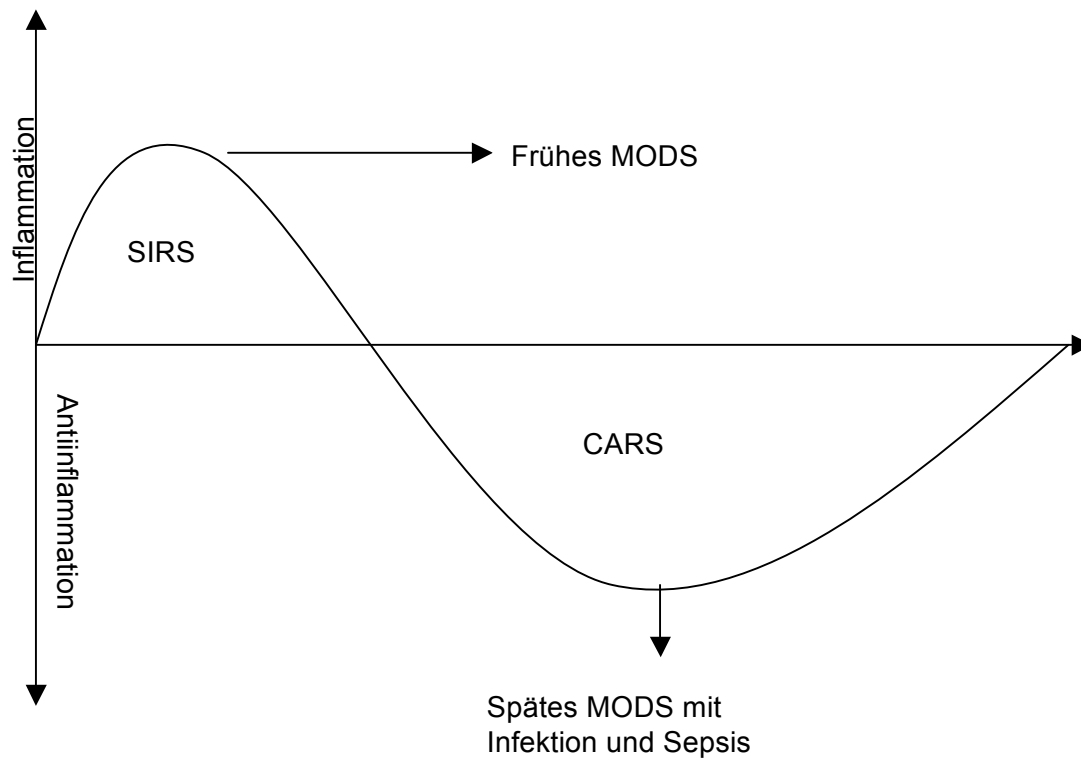


Abb. 1: Zeitlicher Verlauf der Pankreatitis nach Andersson R, Andersson B, 2007 [82].

Die Mortalität der akuten Pankreatitis beträgt bei schweren Verläufen bis zu 20%. Die Todesursachen sind oftmals MODS während der initialen Phase der Erkrankung und die Kombination aus Sepsis und MODS in der späteren Phase der Erkrankung.

2.3.3. Mukosabarriere und akute Pankreatitis

Die Mukosabarriere des Darms hat eine wesentliche Funktion im Verlauf der Pankreatitis. Infektionen des Pankreas und peripankreatische Nekrosen werden meist von gramnegativen Bakterien ausgelöst und gehen mit einer besonders hohen Mortalität einher. Das gramnegative Keimspektrum deutet auf eine Herkunft aus dem Darm sowie eine gestörte Funktion der Darmbarriere hin [83, 84, 85]. Die drei wesentlichen Ursachen für die bakterielle Translokation aus dem Darm stellen das Keimspektrum im Darm, die Änderung der Darmpermeabilität und die gestörte Immunität des Darms dar.

So konnte gezeigt werden, dass eine gramnegative Darmflora bei Patienten, bei denen noch keine Pankreasinfektion aufgetreten war, mit einem erhöhten Auftreten von Infektionen des Pankreas sowie mit einer erhöhten Mortalität einhergehen [86].

Im Tiermodell wurde gezeigt, dass die Permeabilität des Darms für Makromoleküle mit der Schwere der Pankreatitis korreliert [87]. Bei erhöhter Darmpermeabilität waren die Endotoxinspiegel ebenfalls deutlich erhöht, mit erheblich schädlichen Konsequenzen für das Immunsystem [88]. So schaden intravenös applizierte Endotoxine der Granulozyten-Chemotaxis [89] und reduzieren den Anteil an T-Helferzellen im peripheren Blut von gesunden Probanden [90]. Auch das retikuloendotheliale System wird geschädigt [91].

2.4. Diagnostik der akuten Pankreatitis und Prognosefaktoren

Am Anfang der Diagnostik, zur Bestätigung der klinisch gestellten Verdachtsdiagnose, stehen Laboruntersuchungen. Ist die Serumamylase um das Dreifache oder mehr erhöht, so kann die Diagnose einer Pankreatitis gestellt werden. Mögliche Differentialdiagnosen wie eine Speicheldrüsenerkrankung, eine intestinale Perforation oder Infarzierung sind dann so gut wie ausgeschlossen. Es besteht jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe des Amylasewertes und der Schwere der Pankreatitis. Die Sensitivität der Diagnostik wird durch das Bestimmen der wesentlich spezifischeren Pankreaslipase im Serum erhöht. Häufig liegt zudem eine Leukozytose mit 15000 bis 20000 Leukozyten pro Mikroliter vor. Hämatokritwerte von über 50 Prozent können bei schwereren Verläufen eine Hämokonzentration, infolge von Plasmaverlusten in den Retroperitonealraum oder die Bauchhöhle anzeigen. Eine Hyperglykämie kann regelmäßig beobachtet werden. Bei den bildgebenden Verfahren zur Diagnose der Pankreatitis steht die Sonografie an erster Stelle. Das Pankreas lässt sich im Idealfall in vier Ebenen darstellen. Diagnoseweisend sind echoarme Bezirke im Pankreas, wobei man meist nicht zwischen nekrotisch und ödematös veränderten Gewebereichen unterscheiden kann. Ein frühes und unspezifisches Zeichen der Pankreatitis ist die diffuse Vergrößerung des Organs, es gilt aber zu beachten, dass es erhebliche Normvarianten gibt. Oftmals ist die Aussagekraft der Sonografie aufgrund technischer Schwierigkeiten durch den luftgefüllten Darm eingeschränkt. Weit sensitiver als die Sonografie ist die Kontrastmittel verstärkte Computertomographie. Sie dient vor allem der Differenzierung zwischen leichter, ödematöser und hämorrhagisch-nekrotisierender Verlaufsform. Konventionelle Röntgenaufnahmen spielen bei der Diagnosestellung der akuten Pankreatitis eine untergeordnete Rolle. Sie liefern jedoch wesentliche Informationen zu etwaigen Komplikationen. Von großer Bedeutung ist die Identifizierung von Patienten mit einem hohen Risiko für die Entwicklung schwerer Verläufe der akuten Pankreatitis. Eine

frühzeitige Identifizierung solcher Verläufe ist unter anderem ein wichtiges Ziel der Pankreasforschung damit intensivmedizinische Überwachungs- und Therapiemaßnahmen rechtzeitig und indikationsgerecht eingeleitet werden können. Mit den Ranson Kriterien [92], dem Imrie Score [93], der Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE-II) Scale [94] und dem Computed Tomography Severity Index (CTSI) [95] gibt es mehrere Systeme die zur frühen Prognoseabschätzung bei akuter Pankreatitis dienen. Nach Leung et al ist dabei der CTSI sowohl den Ranson Kriterien wie auch der APACHE-II-Scale bezüglich der Sensitivität überlegen [96]. Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Scores in Studien wurde 1993 die Atlanta Klassifikation (Atlanta Classification of Severe Acute Pancreatitis) eingeführt [97].

2.5. Therapie der akuten Pankreatitis

Grundsätzlich erfolgt die Therapie der akuten Pankreatitis stationär. Wichtig ist die engmaschige laborchemische Überwachung des Patienten. Die entscheidende therapeutische Maßnahme ist die ausreichende Substitution des Flüssigkeitsverlusts. Im Weiteren sollte eine suffiziente analgetische Therapie Ziel der Behandlung sein. In neueren Studien wurde überzeugend gezeigt, dass eine generelle Antibiotikaprophylaxe keine Vorteile bietet und nur zur Selektion resistenter Erreger beiträgt. Demgegenüber profitieren Patienten mit nachgewiesener Pankreasnekrose von einer Antibiotikabehandlung [98]. Studien zeigen auch, dass die enterale Ernährung der parenteralen Ernährung überlegen ist [99, 100, 101]. Bei einer Infektion von Pankreasnekrosen besteht die Indikation zur operativen Entfernung der Nekrosen.

3. Immunabwehrmechanismen

3.1. Generelle Prinzipien

Die meisten Mikroorganismen auf die der menschliche Körper täglich trifft, verursachen beim gesunden Menschen keine erkennbare Krankheit. Sie werden bereits nach kurzer Zeit durch das angeborene Immunsystem erkannt und bekämpft. Das angeborene Immunsystem verfügt zwar nicht über die Spezifität der erworbenen Immunität, aber es kann mit Hilfe von Rezeptoren sehr schnell Fremdkörper von körpereigenen Strukturen unterscheiden. Die Toll-like-Rezeptoren (TLR) sind ausschlaggebender Bestandteil der angeborenen Immunität. Sie können krankheitsassoziierte molekulare Muster erkennen (PAMP / pathogen associated molecular patterns), die nur bei pathogenen Mikroorganismen, nicht jedoch bei Körperzellen

vorkommen. TLR sind Transmembranmoleküle, bestehend aus Leucin-reichen extrazellulären Repeats (LRR) und einem zyttoplasmatischen Teil, der dem Interleukin-1 Rezeptor ähnelt und daher als TIR- (Toll/IL-1-Rezeptor-) Domäne bezeichnet wird. Die Familie der Toll-like-Rezeptoren umfasst bisher 11 Mitglieder (TLR 1-11/ siehe Abbildung 3).

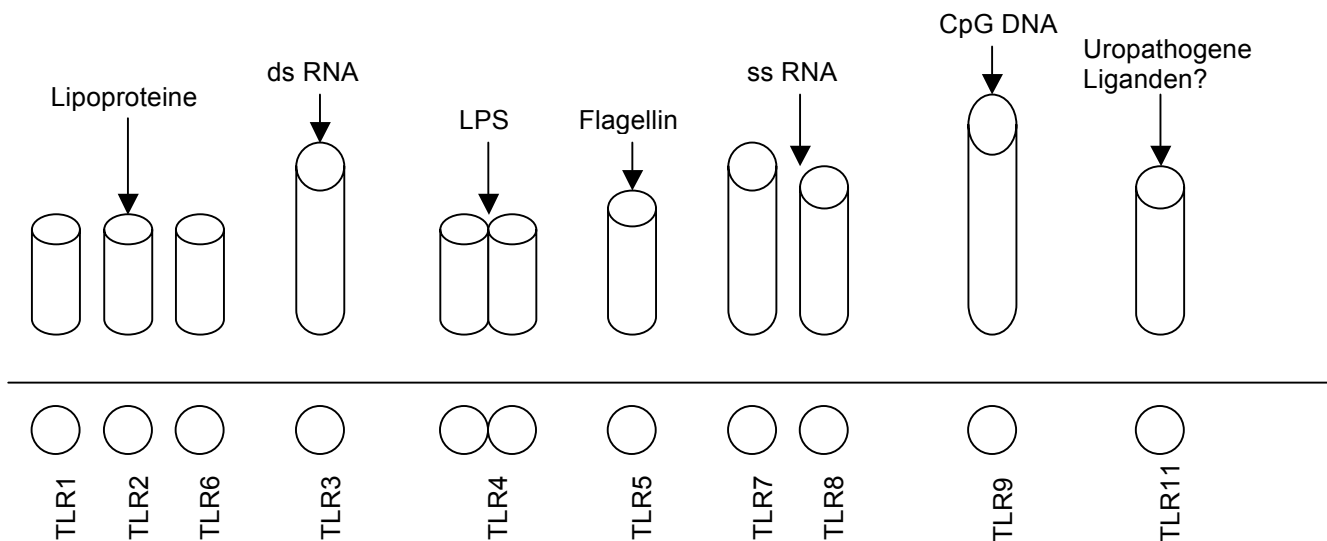


Abb. 2: Übersicht der TLR Rezeptoren mit Liganden nach E. Cario 2005 [156].

Die verschiedenen TLR erkennen selektiv verschiedene PAMPs und führen zu einer verstärkten Synthese inflammatorischer Zytokine. Zur Erkennung bestimmter PAMPs werden Hilfsproteine benötigt. Lipopolysacchariden (LPS) sind Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien [102]. Die Erkennung von LPS erfolgt durch TLR4. Hierbei spielen das LPS-bindende Protein (LBP), der CD14 Rezeptoren und das Glykoprotein MD2 eine Rolle [103]. Für die Signalvermittlung aktivieren die TLRs verschiedene Kofaktoren und Adaptermoleküle. Bisher wurden fünf beim Menschen vorkommende Adaptermoleküle entdeckt:

1. Myeloid differentiation factor 88 (MyD88),
2. MyD88 adaptor-like protein (Mal), auch bekannt als TIR-domain-containing adaptor molecule (TIRAP),
3. TIR-containing adaptor inducing IFN β (TRIF), auch TIRAP-1 oder TICAM-1 genannt,
4. TRIF-related adaptor molecule (TRAM), auch bekannt als TIRAP-2 oder TICAM-2 und
5. sterile α and HEAT-Armadillo motifs (SARM) [104].

TLR Aktivierung führt zur Translokation von zytosolischem NF κ B in den Zellkern. Der klassische Weg der TLR Aktivierung führt, mit Hilfe des Adapterproteins MyD88, zur Aktivierung einer Serin/Threonin-Kinase (serin/threonin innate immunity kinase / SIKK oder IL-1R-associated kinase / IRAK), welche in der Folge zu Phosphorylierung des inhibitorischen Proteins I κ B führt [105]. Nach dieser Phosphorylierung dissoziiert I κ B von NF κ B, mit dem es zuvor im Komplex gebunden war. NF κ B dringt nun in den Zellkern ein und bindet an verschiedene Promotoren. Dadurch wird die Transkription proinflammatorischer Zytokine unter anderem des IL-1, TNF-, IL-6 und IL-8 eingeleitet.

Neben dem beschriebenen gibt es noch mehrere andere Wege auf denen die TLR-Familie zur Aktivierung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen führt. Auf verschiedene Art und Weise reagieren die unterschiedlichen TLRs und tragen so zur Pathogen-Abwehr, Kommensalen Homeostase und zur Verbindung des angeborenen mit dem adaptiven Immunsystem bei.

3.2. NOD – nucleotide-binding oligomerization domain

Neben den TLR existieren auch im Zytoplasma Proteine, die eine Rolle in der angeborenen Immunität spielen. Diese Proteine bestehen meistens aus 3 verschiedenen funktionellen Einheiten: 1) mehrere am C-terminalen Ende gelegene LRR, 2) eine zentral gelegene Nucleotid bindende Domäne und 3) N-terminal gelegene Effektorregionen, wie zum Beispiel Caspase Recruitment Domänen (CARDs) oder Pyrin Domänen. Von dieser sogenannten nucleotide binding oligomerization domain (NOD) Familie sind zwei Proteine am besten untersucht: NOD1 und NOD2. Beide vermitteln nach Kontakt mit bestimmten bakteriellen Liganden proinflammatorische Signale via NF κ B.

NOD2 wird in Monozyten, Makrophagen, T und B Zellen, dendritischen Zellen und intestinalen Epithelzellen [106], wie auch in Paneth Zellen [107] exprimiert.

Tumornekrosefaktor (TNF) induziert eine gesteigerte NOD2 Expression. Dieser Effekt wird durch Interferon- γ (IFN γ) unterstützt [108].

Ligand für NOD2 ist das Muramyl Dipeptid (MDP) [109], ein Bestandteil der Peptidoglycane (PGN) in der Zellwand von sowohl grampositiven wie gramnegativen Bakterien. Es gibt verschiedene Wege, auf denen MDP nichtinvasiver Bakterien zu den zytosolisch gelegenen Rezeptoren kommt. Für Epithelzellen des Colons konnte gezeigt werden, dass der apical peptide transporter PEPT1 die Aufnahme von MDP in die Zelle beeinflusst [110]. PGN kann außerdem durch ein type IV secretion system des Bakteriums *Helicobacter pylori*, welches

auf der *cag* pathogenicity island verschlüsselt ist, in Epithelzellen geschleust werden [111]. Wahrscheinlich gibt es weitere Wege der PGN und MDP Aufnahme in die Zelle, bei denen bakterielle und zelluläre Mechanismen eine Rolle spielen.

Trotz intensiver Forschung ist es bisher nicht gelungen die Wege der Signalvermittlung durch NOD1 und NOD2 detailliert zu beschreiben. So ist unklar ob MDP direkt an die LRR des NOD2 Rezeptors binden, oder ob hierfür Komediatoren notwendig sind. Sowohl NOD1 als auch NOD2 interagieren über ihre CARD mit der CARD der serine/threonine kinase RICK (auch RIP2 oder CARDIAK genannt.) [112]. NOD2 kann in Abhängigkeit vom RICK die Kinase IKK γ (Auch als NEMO bekannt.) ubiquitinylieren, was zumindest zum Teil die Aktivierung von NF κ B beeinflusst [113].

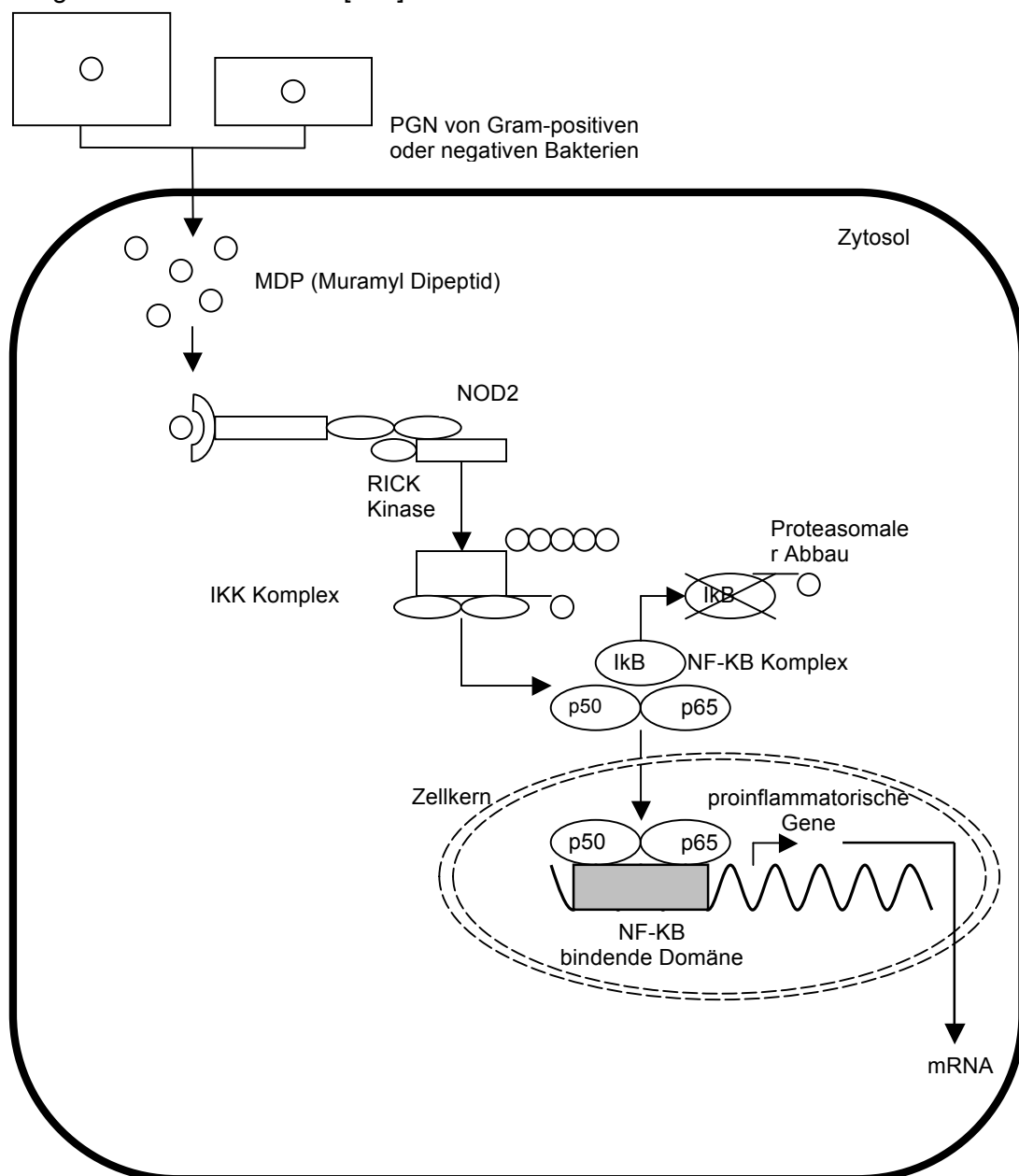


Abb. 3: Schematische Zeichnung des NOD2 Signalwegs (nach Strober et al 2006).

3.2.1. NOD2 Mutationen und die Bedeutung bei Morbus Crohn

Das Nod2 Gen wurde zuerst in Zusammenhang mit Morbus Crohn entdeckt. Im Sommer 2001 publizierten 3 Gruppen unabhängig voneinander Mutationen im Nod2 Gen als prädisponierende Faktoren für Morbus Crohn [114, 115, 116]. Es konnten 3 wesentliche Mutationen entdeckt werden, die für den Hauptteil des genetischen Risikos verantwortlich sind. Diese wurden mit SNP8, SNP12 und SNP13 bezeichnet [114]. Bei den ersten beiden handelt es sich um Aminosäuresubstitutionen (R702W, G908R), die die LRR-Region des NOD2 Molekül betreffen. Die SNP13 Mutation welche in einer C-Insertion besteht (3020insC), führt zu einem verfrühten Stop-Codon, wodurch ein verkürztes Protein resultiert.

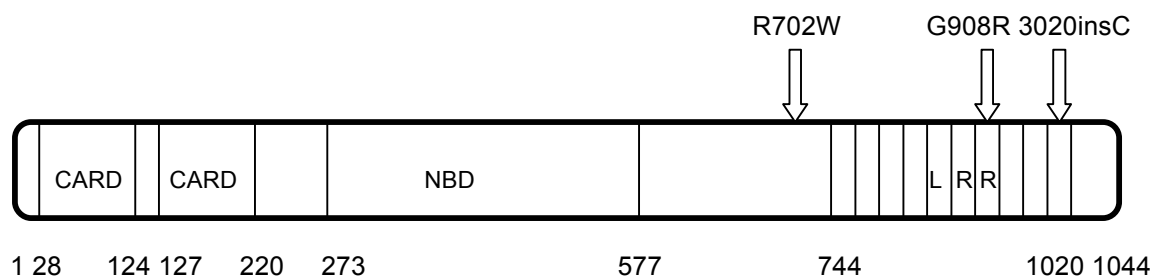


Abb 4: Schematische Struktur des NOD2 Proteins mit den 3 häufigsten Mutationen.

Weitere Mutationen wurden in der Nucleotid-bindenden Domäne des NOD2 Gens entdeckt. Diese scheinen mit einer Aktivitätszunahme des Gens einherzugehen und sind zum Beispiel mit dem Blau Syndrom assoziiert [117]. Dagegen gehen die Mutationen des NOD2 Gens in der LRR Region welche beim Morbus Crohn vorkommen eher mit einem Funktionsverlust einher.

Es gibt mehrere Theorien auf welchem Weg die Mutationen des NOD2 Gens die Prädisposition für Morbus Crohn verursachen. Eine Theorie stützt sich auf die Rolle des NOD2 Rezeptors bei der Abwehrfunktion der Darmschleimhaut. Es konnte gezeigt werden, dass NOD2-Knockout Mäuse anfällig für orale Infektionen mit *Listeria monocytogenes* waren, nicht aber bei peritonealer oder intravenöser Applikation des Bakteriums [118]. Diese Beobachtung könnte eine Folge der beeinträchtigten, NOD2-abhängigen α -Defensin Produktion durch Paneth-Zellen sein [119, 120, 121]. Die mangelnde α -Defensin Produktion könnte auf diesem Weg zur Besiedlung des Darms mit Bakterien führen, welche den Morbus Crohn verursachen. Diese Theorie wird durch die Beobachtung unterstützt, dass in von Morbus Crohn betroffenen Ileumabschnitten eine herabgesetzte α -Defensin-Produktion

beobachtet wurde. Bei Patienten mit Morbus Crohn und NOD2 Mutationen war die Einschränkung der α -Defensin Produktion besonders hoch [122].

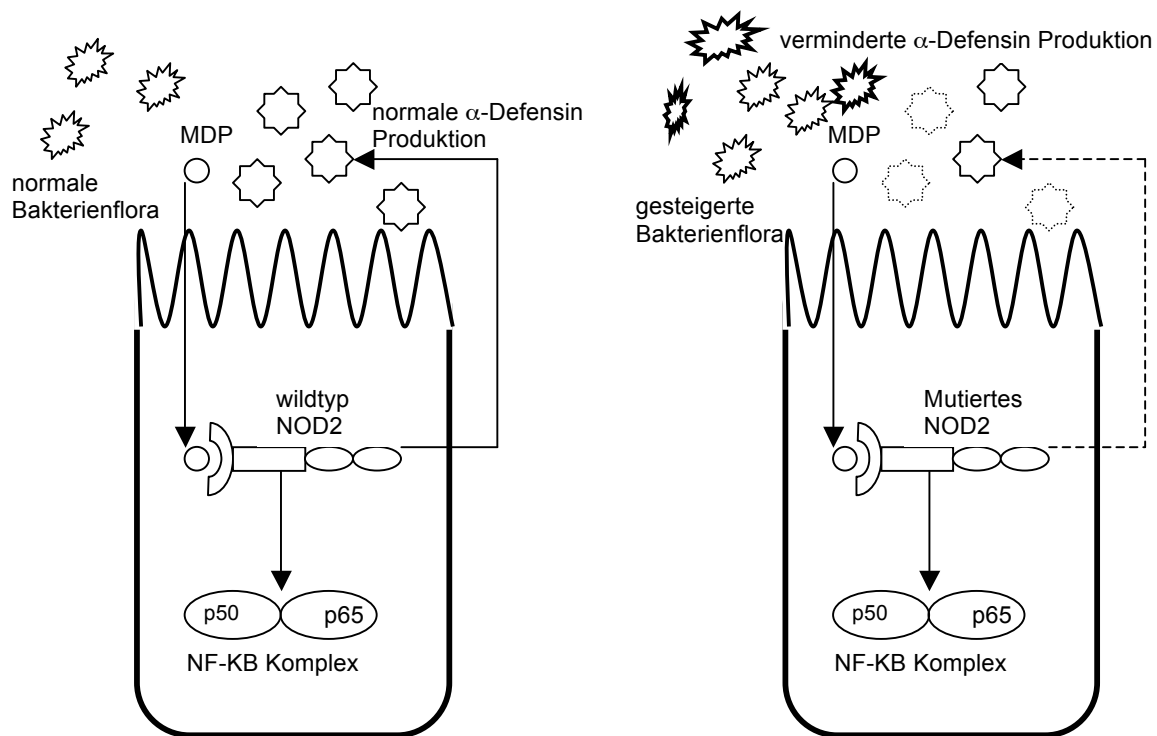


Abb. 5: Schematische Darstellung des Einflusses von NOD2 Mutationen auf α -Defensin Produktion

Auch wurde eine fehlerhafte Ausreifung und Proliferation von dendritischen Zellen bei Morbus Crohn Patienten mit NOD2 Mutation beschrieben [123]. Diese könnte eine anormale Aktivierung und Differenzierung von T Zellen zufolge haben und damit eine Änderung in der erworbenen Immunabwehr gegenüber der Darmflora hervorrufen [124].

Weitere Erklärungsmodelle zum Einfluss der NOD2 Mutationen auf die Entstehung des Morbus Crohn gehen von einer überschießenden Produktion proinflammatorischer Zytokine als Folge der NOD2-Mutation aus. Dabei beruht ein Modell auf einer Funktionszunahme durch die 3020insC Mutation [125]. Ein anderes geht von einer Funktionsabnahme durch die NOD2 Mutationen aus. In diesem Modell führt die vermehrte Aktivität des Toll-like Rezeptors 2 (TLR2), dessen Signalweg normalerweise durch NOD2 inhibiert wird, zu einer verstärkten

Produktion proinflammatorischer Zytokine [126]. Diese drei Modelle werden zurzeit kontrovers diskutiert.

4. Ziele der Untersuchung

Wir stellten die Hypothese auf, dass bei Patienten mit bestimmten NOD2 Mutation häufiger schwere Verläufe der akuten Pankreatitis auftreten. Die zugrunde liegende Annahme war, dass NOD2 Mutationen die Darmbarriere schwächen und es somit im Laufe einer Pankreatitis häufiger zu bakteriellen Infekten des Pankreas kommt. Diese gehen mit schwereren Verläufen der Pankreatitis einher.

Hierzu wurden die Prävalenzen der drei in Assoziation zu Morbus Crohn stehenden Mutationen des NOD2 Gens (R702W, G908R, 3020insC) bei Patienten die an einer akuten Pankreatitis erkrankt waren untersucht. Sollte die Hypothese zutreffen müsste bei Patienten mit schwerer Pankreatitis im Vergleich zu Patienten mit milder Pankreatitis eine erhöhte Prävalenz der NOD2 Mutationen vorliegen.

Gemäß unserer Hypothese würden sich die Mutationen lediglich auf den Verlauf der Pankreatitis auswirken, nicht jedoch auf die Inzidenz. Somit sollten die Prävalenzen der NOD2 Mutationen einer Kontrollgruppe zwischen denen der milden und schweren Pankreatitisverläufe liegen.

Diese Hypothese wurde an Patientengruppen mit milden und schweren Pankreatitisverläufen untersucht. Als schwer wurden die Verläufe eingestuft, bei denen Organ- oder Multiorganversagen auftraten, oder wenn Nekrosen im Pankreas mittels CT nachgewiesen werden konnten. Ferner wurde die Prävalenz der NOD2 Mutationen in der Normalbevölkerung bestimmt.

5. Material und Methoden

5.1. Studienpatienten

5.1.1. Magdeburg Untersuchungsgruppe

Von der Magdeburger Universitätsklinik wurden uns 146 Blutproben von stationär behandelten Patienten mit akuter Pankreatitis, zur Untersuchung zur Verfügung gestellt. Die Blutproben wurden entsprechend des Verlaufs der Erkrankung in vier Gruppen eingeteilt. Dabei wurde der Verlauf bei 32 Patienten als milde Pankreatitis eingestuft, bei 45 Patienten traten lokale Komplikationen auf, 49 Patienten überlebten ein Organversagen, 20 Patienten starben während des Behandlungsverlaufs.

5.1.2. Greifswald Untersuchungsgruppe

Aus Greifswald standen 46 Blutproben von Patienten, die wegen einer schweren akuten Pankreatitis in der Klinik für Innere Medizin am Universitätsklinikum stationär behandelt wurden bereit. Die Diagnose einer Pankreatitis wurde gestellt wenn bei Oberbauchschmerzen die Amylase und Lipase im Serum auf mindestens das dreifache der Norm erhöht waren, sowie wenn mittels Bildgebung Zeichen einer Pankreatitis nachgewiesen wurden. Der Verlauf der Pankreatitis aller 46 Patienten wurde als schwer eingestuft. Der Verlauf der Pankreatitis wurde bei diesen Patienten als schwer eingestuft, da Organ- oder Multiorganversagen auftraten, oder Nekrosen im CT nachgewiesen wurden. Acht Patienten verstarben während des Krankenhausaufenthalts, 38 überlebten die Pankreatitis.

5.1.3. Greifswald Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe standen 120 Blutspender aus der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Greifswald zur Verfügung.

5.1.4. Definition der Studien-Kohorten

Zum Einschluß in die Studie musste eine Pankreatitis diagnostiziert werden. Hierfür musste bei klinischem Bild eine Erhöhung der Amylase und der Lipase auf das dreifache der Norm

nachgewiesen werden. Häufig ließen sich die Pankreatitis mit bildgebenden Verfahren wie Sonographie oder CT bestätigen. Der Schweregrad der Pankreatitis der einzelnen Patienten wurde jeweils von den behandelnden Ärzten eingeschätzt und in Folge dessen den einzelnen Gruppen zugeteilt. Dabei orientierten sich die Ärzte in ihrer Einteilung des Schweregrades an der Atlanta-Klassifikation. Ob und welche Pankreatitis Scores bei den Magdeburger Patienten hierzu verwandt wurden ist nicht bekannt, womit die Einteilung nicht nach standardisierten Kriterien durchgeführt wurde. Die Kontrollgruppe aus Greifswald rekrutierte sich aus Blutspendern der Universitätsklinik Greifswald. Da eine überstandene Pankreatitis kein Ausschlusskriterium zur Blutspende darstellt ist es möglich, dass sich auch in der Kontrollgruppe Personen befinden, die schon mal eine akute Pankreatitis durchgemacht haben. Gemessen an der Inzidenz der Pankreatitis in Deutschland [1] dürfte dieser Einfluss aber vernachlässigbar sein.

5.2. Methoden

5.2.1. DNA Extraktion

Die DNA wurde aus EDTA Blutproben der Patienten mit Hilfe des QIAamp[®] DNA Mini Kit extrahiert. Die Blutproben wurden bis zur Verarbeitung bei -20°C gelagert. Die Extraktion erfolgte in mehreren Schritten. Als erstes wurde 20µl Protease in ein 1,5ml Eppendorf Tube pipetiert. Anschließend wurden 200µl der Probe hinzugegeben. Nach Möglichkeit wurde Buffy Coat verwandt. War dieser nach der Zentrifugation des bei Raumtemperatur aufgetauten Probenblutes nicht sichtbar, wurde die DNA aus dem korpuskulären Anteil des Zentrifugats gewonnen. Dann wurden 200µl des AL Puffers hinzu gegeben und eine homogene Lösung mit dem Vortexer erzeugt. Die Lösung wurde zur Zelllyse anschließend zehn Minuten bei 56°C im Heizblock inkubiert. Danach wurden 200µl Ethanol hinzu pipetiert um die Lösung im Anschluss auf die Säulen aufzutragen. Beim der folgenden Zentrifugation setzte sich die DNA in der Matrix der Säule fest. Das Filtrat wurde verworfen. Im Weiteren wurden zwei Waschschriffe mit jeweils 500µl zweier verschiedener Waschpuffer durchgeführt. Beim zweiten Waschschriff wurde die Zentrifugation nach Verwerfung des Filtrats noch mal wiederholt um sämtlichen Waschpuffer zu entfernen. Schließlich wurde die Säule mit 200µl eines Auswaschpuffers für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Säule wurde dann in ein neues Eppendorf 1,5ml Gefäß gestellt um die gesäuberte DNA mit der letzten Zentrifugation heraus zu waschen. Zur Erfolgskontrolle wurde die isolierte DNA auf ein ein-prozentiges Agarose Gel aufgetragen, welches Ethidiumbromid enthielt. Nach einer Laufzeit von 45 Minuten bei einer Spannung von 70 Volt wurde das Gel unter UV Licht

betrachtet. Da Ethidiumbromid mit der DNA interkaliert und unter UV Licht Anregung fluoresziert, konnte nun die DNA als Bande auf dem Gel betrachtet werden.

5.2.2. Real-Time PCR

Ein TaqMan-Assay wurde benutzt um aus den vorhandenen DNA Proben diejenigen zu identifizieren welche im NOD2 Gen eine der beschriebenen Sequenzvariationen aufweisen.

TaqMan-Prinzip: Die real time PCR beruht auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR, wobei sich hier zusätzlich weitere Möglichkeiten wie zum Beispiel der Quantifizierung der DNA oder der Unterscheidung von heterozygoten und homozygoten DNA-Strängen bietet. Die Auswertung erfolgt über eine Fluoreszenzmessung während des PCR-Vorgangs. Die Fluoreszenz nimmt mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht. Die Fluoreszenz kommt über Sonden zustande, die den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer ausnutzen. Hierbei wird ein Donor-Fluorochrom (Reporter) durch eine Lichtquelle angeregt und gibt einen Teil seiner Energie an ein in ausreichender Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) ab. Wird die Sonde an der sich Reporter und Quencher befinden im Laufe der PCR durch die 5'–3' Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase gespalten, so nimmt die Fluoreszenz des Reporters zu. Die Sonden bestehen aus Oligonukleotiden welche während der Anealing-Phase der PCR gebunden werden und im Laufe der Replikationsphase gespalten werden. Dabei werden der an einem Ende befindliche Reporter und der am anderen Ende befindliche Quencher getrennt. Für die Unterscheidung von homozygoten und heterozygoten DNA Strängen werden zwei Sequenz-spezifische Sonden mit verschiedenen Fluorochromen und Oligonukleotiden verwendet. Dabei wird das Oligonukleotid welches an die Wildtyp Sequenz bindet mit einem Fluorochrom gekoppelt und das Oligonukleotid welches mit der Mutante bindet an ein Fluorochrom gekoppelt, welches bei einer anderen Frequenz emittiert. Bei der Durchführung der real time PCR steigt beim Vorliegen des Wildtyps nur die Fluoreszenz der gespaltenen Wildtypsonde. Beim Vorliegen einer heterozygoten Mutation steigt die Fluoreszenz beider verwendeter Fluorochrome und bei einem etwaigen Vorliegen einer homozygoten Mutation steigt nur die Fluoreszenz des Fluorochroms welches an die mutationsbindende Sonde gekoppelt wurde.

Durchführung:

Für die realtime PCR wurden folgende Materialien verwendet:

Reagens	Konzentration	Volumen (µl)
DNA	100 ng/µl	3
Primer sense	10 µM	0,6
Primer antisense	10 µM	0,6
Sonde Wildtyp (Fam)	10 µM	0,4
Sonde Mutante (TET)	10 µM	0,4
Taq-Polymerase-mix		10
H ₂ O		5

Tab. 3: Materialien der RT-PCR.

Es wurden folgende Primer verwendet:

Name	Sequenz
SNP8-S	5'-TTC CTG GCA GGG CTG TTG TC-3'
SNP8-AS	5'-AGT GGA AGT GCT TGC GGA GG-3'
SNP12-S	5'-ACT CAC TGA CAC TGT CTG TTG ACT CT-3'
SNP12-AS	5'-AGC CAC CTC AAG CTC TGG TG-3'
SNP13-S	5'-GTC CAA TAA CTG CAT CAC CTA CCT AG-3'
SNP13-AS	5'-CTT ACC AGA CTT CCA GGA TGG TGT-3'

Tab. 4: Primer der RT-PCR.

Es wurden folgende Sonden verwendet:

Name	Sequenz	Modifikation 5'	Modifikation 3'
SNP8-wt	5'-CCT GCT CCG GCG CCA GGC-3'	FAM	TAMRA
SNP12-wt	5'-TTT TCA GAT TCT GGG GCA ACA GAG TGG GT-3'	FAM	TAMRA
SNP13-wt	5'-CCC TCC TGC AGG CCC TTG AAA-3'	FAM	TAMRA
SNP8-mut	5'-CCT GCT CTG GCG CCA GGC C-3'	TET	TAMRA
SNP12-mut	5'-TTC AGA TTC TGG CGC AAC AGA GTG GGT-3'	TET	TAMRA
SNP13-mut	5'-CCT CCT GCA GGC CCC TTG AAA-3'	TET	TAMRA

Tab. 5: Sonden der RT-PCR.

Die realtime PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

	Zyklenanzahl	Zyklendauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	1	10min	95°C
Denaturierung	40	15s	95°C
Primer und Sondenanlagerung und Extension	40	1min	64°C

Tab. 6: Zyklen der RT-PCR.

5.2.3. PCR und Sequenzierung

PCR und anschließende Sequenzierung wurden als Bestätigung bei denjenigen DNA Proben durchgeführt, die zuvor mittels der TaqMan-Analyse als mutationstragend identifiziert worden waren.

5.2.3.1. PCR

Prinzip: Die PCR dient dazu kurze, genau definierte Teile der DNA zu vervielfältigen. Hierzu benötigt man eine genomische DNA, die den gewünschten DNA Abschnitt enthält. Im Weiteren benötigt man zwei Primer, um Beginn und Ende des gewünschten DNA Fragments zu bestimmen, eine DNA Polymerase, um den eigentlichen Replikationsvorgang durchzuführen. Außerdem werden Nukleotide als Bausteine für die zu synthetisierenden DNA Stränge benötigt. Zuletzt wird mit einer Pufferlösung die benötigte chemische Umgebung für die Reaktion hergestellt. Die Reaktion findet im Thermocycler statt. Diese Maschine ist programmierbar und stellt die während der einzelnen Phasen der PCR gewünschten Temperaturen her.

Die PCR findet in mehreren Zyklen statt. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten. In Schritt eins findet das Denaturieren der doppelsträngigen DNA statt. Hierbei werden bei 96°C die Wasserstoffbrückenbindungen die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten gelöst. Vor dem ersten Zyklus wird diese Denaturierung meist für eine längere Zeit durchgeführt, um ein vollständiges Trennen der Ausgangs DNA und der Primer sicherzustellen.

Wenn die DNA nun in Einzelsträngen vorliegt, wird die Temperatur auf 50-65°C abgesenkt, um ein Anlagern der Primer an die DNA-Stränge zu ermöglichen. Diese Phase wird auch als Annealingphase bezeichnet.

Im letzten Schritt synthetisiert die DNA Polymerase den neuen DNA Abschnitt, indem sie an der 3'-OH Gruppe der Primern beginnt die Nukleotide entsprechend dem originalen DNA-Strang anzubauen. Dieser Schritt findet, je nach Polymerase, bei 65-75° C statt. Hierbei entsteht immer ein dem originalen DNA-Strang komplementärer DNA-Strang. Daher müssen immer sense und antisense Primer verwendet werden um pro Zyklus neue sense und antisense Stränge und somit neue Doppelstränge zu erhalten. Pro Zyklus wird so die DNA Menge des gewünschten Fragments verdoppelt.

Praktische Durchführung:

Für die PCR wurden folgende Chemikalien verwendet:

Reagenz	Konzentration	Volumen (µl)
Primer sense	25pmol/µl	1µl
Primer antisense	25pmol/µl	1µl
PCR-Polymerase Mix (Fermentas)		20µl
DNA	100ng/µl	3µl
H ₂ O		15µl

Tab. 7: Materialien der PCR.

Die PCR wurde bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

	Zyklenzahl	Zyklendauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	1	600s	95°C
Denaturierung	35	15s	95°C
Primer Anlagerung	35	15s	64°C
Extension	35	45s	72°C
Finale Extension	1	120s	72°C

Tab. 8: Zyklen der PCR.

Verwendete Primer:

Name	Sequenz
SNP8-S	5'-TTC CTG GCA GGG CTG TTG TC-3'
SNP8-AS	5'-AGT GGA AGT GCT TGC GGA GG-3'
SNP12-S	5'-ACT CAC TGA CAC TGT CTG TTG ACT CT-3'
SNP12-AS	5'-AGC CAC CTC AAG CTC TGG TG-3'
SNP13-S	5'-GTC CAA TAA CTG CAT CAC CTA CCT AG-3'
SNP13-AS	5'-CTT ACC AGA CTT CCA GGA TGG TGT-3'

Tab. 9: Verwendete PCR Primer.

5.2.3.2. Sequenzierung

Prinzip: Die Sequenzierung eines DNA Abschnitts erfolgt nach der Vervielfältigung des Abschnitts durch eine PCR Reaktion. Auch die Sequenzierreaktion verläuft nach dem Prinzip der PCR Reaktion. Es gilt aber ein paar Besonderheiten zu beachten. So wird nur ein Primer verwendet, um entweder sense oder antisense Strang zu sequenzieren. Und es werden außer den Desoxynukleotiden auch Didesoxynukleotide als Bausteine der Reaktion beigegeben. Nach Einbau der Didesoxynukleotide bricht die Sequenzierreaktion ab, da hier auf Grund einer fehlenden 3'-OH Gruppe keine weiteren Nukleotide mehr angehängt werden können. Da der Einbau der Didesoxynukleotide zufällig erfolgt, entstehen bis zum Ende der Reaktion DNA Fragmente verschiedener Größe, die an ihrem Ende ein Didesoxynukleotid tragen. Die 4 Didesoxynukleotide G,A,T,C sind mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekennzeichnet, Im Anschluß an die Reaktion, die wie die PCR im Thermocycler stattfindet werden die Proben aufgereinigt, um überzählige Primer und Nukleotide zu entfernen. Die am Ende der Aufreinigung erhaltenen DNA-Pellets werden in einem Laufpuffer gelöst. Dann werden die Proben zur Auswertung auf das Gel des Plattensequenzierers aufgetragen. Im Sequenziergel wandern die Proben beim vorliegenden Elektrophoresestrom unterschiedlich schnell und trennen sich so ihrer Größe nach auf. Die kleinsten Fragmente wandern im Gel am schnellsten und kommen so zuerst am Detektionspunkt des Sequenziergeräts vorbei. Hier wird der Fluoreszenzfarbstoff der Didesoxynukleotide per Laser angeregt und fluoresziert so in der für die jeweilige Base spezifischen Farbe. Diese Fluoreszenzsignale werden vom Sequenziergerät als Elektropherogramm gespeichert und in eine Sequenzdatei abgelegt.. Das Elektropherogramm kann man anschließend mit einem Programm wie zum Beispiel Chromas™ auswerten.

Praktische Durchführung:

Für die Sequenzierreaktion wurden folgende Materialien verwendet:

Reagenz	Konzentration	Volumen (µl)
Ready Reaction Premix Big Dye 3.1 (Applied Biosystems)	(2,5x)	1
Sequencing buffer (Applied Biosystems)	(5x)	1,5
gDNA	ca. 10ng/µl	3
Primer	0,8µM	2
H ₂ O		2,5 (ad 10)

Tab. 10: Sequenzierungsmaterialien.

Die Pipettierung der einzelnen Komponenten erfolgte auf Eis. Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

	Zyklenzahl	Zyklendauer	Temperatur
Initiale Denaturierung	1	2min	96°C
Denaturierung	30	10s	96°C
Primeranlagerung	30	10s	50°C
Extension	30	3min	60°C

Tab. 11: Zyklen der Sequenzierung.

Die Aufreinigung der Proben erfolgte in folgenden Schritten:

Zu dem Sequenzierreaktionsprodukt wurden 75µl 95% Ethanol und 3µl 3M Natriumacetat hinzupipettiert. Nach anschließend kurzem Mischen wurden die Proben bei Raumtemperatur 15min inkubiert und danach 30min bei 15000g zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde quantitativ entfernt und es wurden 250µl 70% Ethanol hinzupipettiert. Nach kurzem Mischen wurde bei erneut 15000g für 5min zentrifugiert. Im Anschluss wurde abermals die überstehende Flüssigkeit quantitativ entfernt um anschließend das entstandene Pellet bei 90°C auf dem Heizblock zu trocknen. Das getrocknete Pellet wurde in 5µl Auftragepuffer aufgenommen und bis zur Sequenzierung auf Eis gestellt oder bei -20°C gelagert.

Der Auftragepuffer setzte sich folgendermaßen zusammen:

Reagenz	Volumen / Menge
Formamid	5 vol
25mM EDTA pH 8,0	1 vol
Blue dextran	50mg/ml

Tab. 12: Zusammensetzung des Auftragepuffers.

Für das Sequenziergel wurden folgende Chemikalien verwendet:

Reagenz	Menge
Harnstoff	18g
H ₂ O	21,5ml
TEMED	25µl
TEE	6ml
Acrylamid Page Plus?	5,3ml
APS?	250µl

Tab. 13: Material des Sequenziergels.

Bei der Herstellung des Gels wurde zuerst Urea in H₂O aufgelöst. Anschließend wurden die anderen Reagenzien zugegeben. APS wurde als letztes hinzugefügt, da unmittelbar nach

Zugabe des APS die Polymerisation des Gels beginnt. Die Elektrophorese zur Sequenzierung wurde in einem Sequenziergerät von Applied Bioscience (373/377) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels Chromas™ ausgewertet.

Mit den zu Beginn verwendeten Primer waren die Ergebnisse der Plattensequenzierung oft nicht eindeutig auszuwerten. Die dargestellten Chromatogramme enthielten im fraglichen DNA Abschnitt Sequenzüberlagerungen, so dass keine Zuordnung zu Wildtyp oder Mutante möglich war. Auch mit einer anderen Aufreinigungsmethode der Sequenzierreaktionsprodukte über Säulen wurden die Ergebnisse nicht besser. Da die Chromatogramme mit zunehmender Länge besser lesbar sind, wurde die Sequenzierreaktion nochmals mit weiter up- bzw. downstream liegenden Primern wiederholt, so dass sich ein längeres DNA Fragment ergab.

Folgende neue Primer wurden verwendet:

Name	Sequenz
SNP8-Sneu	5'-GCA GCG TGG CAG CTT TGC TGC AG-3'
SNP12-Sneu	5'-CCT CTG GCT GGG ACT GCA GAG GG-3'
SNP13-Sneu	5'-CTG GCT AAC TCC TGC AGT CTC T-3'

Tab. 14: Neue Sequenzierungsprimer.

Die mittels der längeren DNA Fragmente hergestellten Chromatogramme lieferten eindeutige Ergebnisse.

5.3. Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe eines Programms das durch die Helmholtzgesellschaft auf der Internetseite <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl> zur Verfügung gestellt wird gemacht. Durch das Programm kommen Tests zur Abweichung von dem Hardy-Weinberg Gleichgewicht zur Anwendung. Hierbei werden Pearson's goodness-of-fit Chi-Quadrat, bzw. Fisher-Exact test verwendet. Zusätzlich erfolgt die Analyse der Daten mit Assoziations-Test mit Chi-Quadrat test nach Sasieni. Dabei wird auch ein Armitage Trend test durchgeführt. Dieser misst ob ein scheinbar vorliegender Trend auch statistisch nachweisbar ist.

Hiermit konnte errechnet werden ob die Allelfrequenz signifikant unterschiedlich ist, ob Heterozygotie bzw. Homozygotie einen Risikofaktor darstellt und zusätzlich wurde ein Armitage trend test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p=0,05$ festgelegt.

6. Ergebnisse

Die Häufigkeit der 3 in Assoziation zu Morbus Crohn stehenden Mutationen des NOD2 Gens wurde an insgesamt 312 Blutproben untersucht. Diese sind im Einzelnen:

SNP 8 mit der Referenz SNP ID Nummer rs2066844 in der SNP-Database. Bei dieser Mutation besteht ein Nukleotidaustausch an Position 2104 von Cytosin zu Thymin. Dies bewirkt daß im codierten Protein an Stelle 702 Tryptophan anstelle von Arginin vorhanden ist.

SNP 12, rs2066845. Nukleotidaustausch an Position 2722 von Guanin zu Cytosin.

Aminosäurentausch an Position 908 von Glycin zu Arginin.

SNP13, rs5743293. Hier fehlt an Position 3019 ein Nukleotid (Thymin). In der Folge kommt es zu einer Leserasterverschiebung.

Die untersuchten Blutproben stammten von 192 Patienten die an einer Pankreatitis erkrankt waren und 120 Kontrollen von Blutspendern aus Greifswald. Die Blutproben der Patienten stammten aus Greifswald und Magdeburg. Dabei war der Verlauf der Pankreatitis der Patienten aus Greifswald als schwer eingestuft worden. Aus Magdeburg wurden auch Patienten mit einer milden Pankreatitis untersucht.

6.1. Chromatogramme

Die Stelle der Mutation ist jeweils per Pfeil (→) gekennzeichnet.

6.1.1.

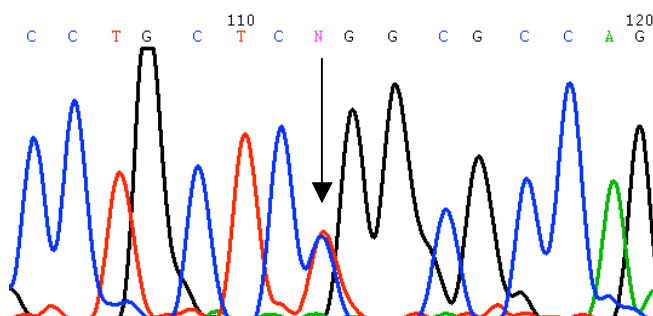


Abb. 6: SNP8 R702W heterozygote Mutation.

6.1.2.

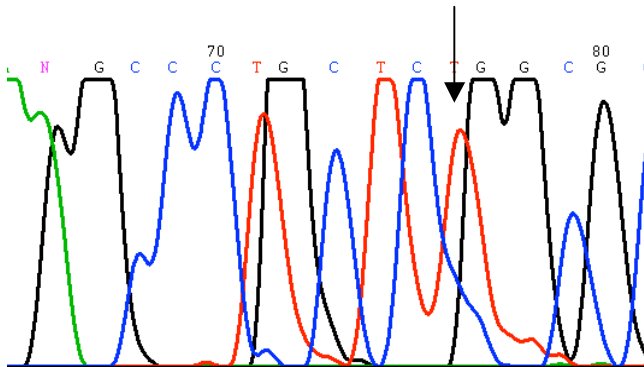


Abb. 7: SNP8 R702W homozygote Mutation.

6.1.3.

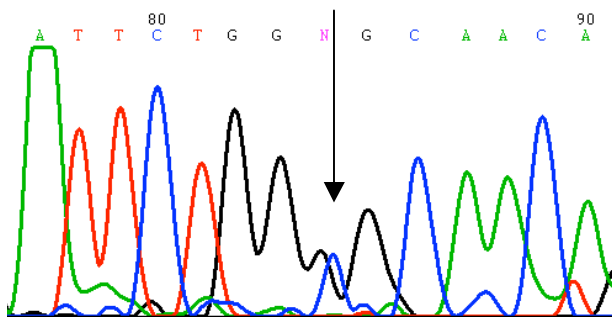


Abb. 8: SNP12 R910I heterozygote Mutation.

6.1.4.

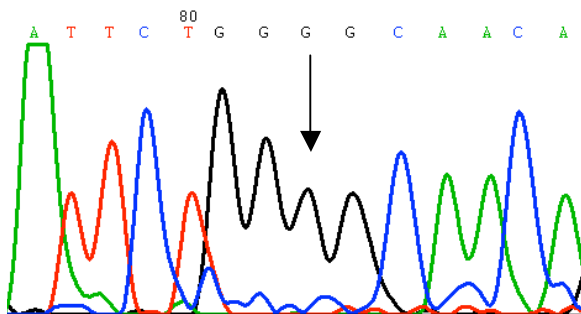


Abb. 9: SNP12 wildtyp.

6.1.5.

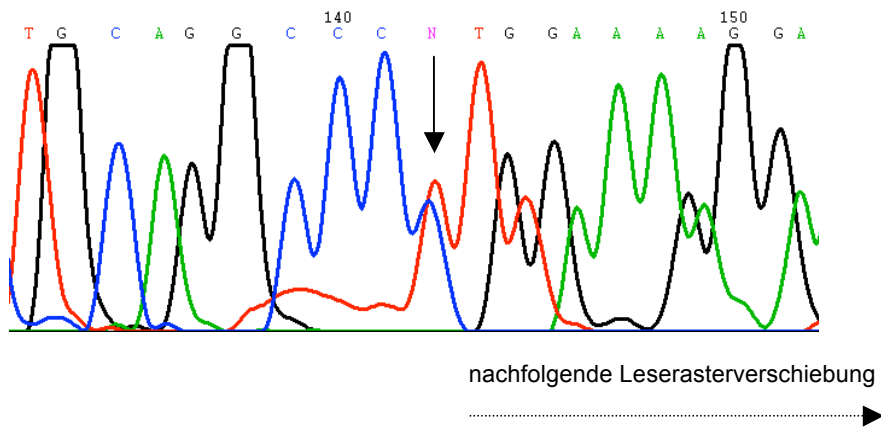


Abb. 10: SNP13 3020InsC heterozygote Mutation.

6.1.6.

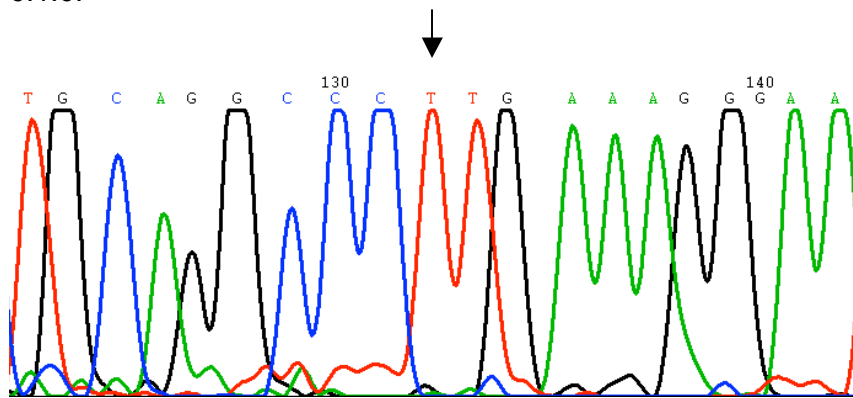


Abb. 11: SNP13 wildtyp.

6.2. Häufigkeit der NOD2 Gen Mutationen (SNP 8, SNP 12, SNP 13)

Das Magdeburger Kollektiv (M) ist nach dem Schweregrad der Pankreatitis in vier Gruppen eingeteilt (M1-M4). Patienten der ersten Gruppe (M1) hatten eine milde ödematöse Pankreatitis mit bledem Verlauf. Patienten der zweiten Gruppe (M2) traten lokale Komplikationen wie zum Beispiel Nekrosen, Abzess oder Pseudozysten auf. Die dritte Gruppe (M3) überlebte ein Organversagen, wie akutes Nierenversagen, Adult respiratory distress syndrom (ARDS) oder disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) während des Krankheitsverlaufs. Die Patienten der vierten Gruppe (M4) starben im Verlauf der Erkrankung an schweren Komplikationen. Die Greifswalder Patienten (G) hatten alle einen schweren Krankheitsverlauf mit Organ- oder Multiorganversagen oder durch CT nachgewiesene Nekrosen. Sie wurden zur Analyse ebenfalls in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste (G1) hat die Erkrankung überlebt, die Patienten der zweiten Gruppe (G2) sind im Verlauf verstorben.

	n	SNP8				SNP12				SNP13			
		wt/wt	M/wt	M/M	pM	wt/wt	M/wt	M/M	pM	wt/wt	M/wt	M/M	pM
Magdeburg M1	32	25	7	0	0,1094	32	0	0	0	31	1	0	0,0156
Magdeburg M2	45	39	6	0	0,0667	44	1	0	0,0111	41	4	0	0,0444
Magdeburg M3	49	44	5	0	0,051	45	4	0	0,0408	45	4	0	0,0408
Magdeburg M4	20	16	4	0	0,1	19	1	0	0,025	18	2	0	0,05
Magdeburg M	146	124	22	0	0,0753	140	6	0	0,0205	135	11	0	0,0377
Greifswald-G1	38	37	1	0	0,0132	37	1	0	0,0132	38	0	0	0
Greifswald-G2	8	6	1	1	0,1875	8	0	0	0	8	0	0	0
Greifswald-G	46	43	2	1	0,0435	45	1	0	0,0109	46	0	0	0
M1+2	77	64	13	0	0,0844	76	1	0	0,0065	72	5	0	0,0325
M3+4	69	60	9	0	0,0652	64	5	0	0,0362	63	6	0	0,0435
M1+2+3	126	108	18	0	0,0714	121	5	0	0,0198	117	9	0	0,0357
M3+G1	87	81	6	0	0,0345	82	5	0	0,0287	83	4	0	0,023
M4+G2	28	22	5	1	0,125	27	1	0	0,0179	26	2	0	0,0357
HGW-Kontrollen	120	107	13	0	0,0542	114	6	0	0,025	114	6	0	0,025

Tab. 15: Häufigkeit der NOD2 Mutationen in den untersuchten Patientengruppen:

wt: Wildtyp, M Mutiertes Allel, pM Häufigkeit von mutierten Allelen.

	n	SNP8+SNP12+SNP13			pM
		wt/wt	M/wt	M/M	
Magdeburg M1	32	26	8	0	0,1250
Magdeburg M2	45	34	11	0	0,1222
Magdeburg M3	49	36	13	0	0,1327
Magdeburg M4	20	14	7	0	0,1750
Magdeburg M	146	107	39	0	0,1336
Greifswald-G1	38	36	2	0	0,0263
Greifswald-G2	8	6	1	1	0,1875
Greifswald-G	46	42	3	1	0,0543
M1+2	77	58	19	0	0,1234
M3+4	69	49	20	0	0,1449
M1+2+3	126	94	32	0	0,1270
M3+G1	87	72	15	0	0,0862
M4+G2	28	19	8	1	0,1786
HGW-Kontrollen	120	95	25	0	0,1042

Tab. 16: Summe aller Mutationen in den Patientengruppen

6.3 Statistische Auswertung

Wie bereits erwähnt erfolgte die Auswertung mit Hilfe eines im Internet zur Verfügung gestellten Programms der Helmholtzgesellschaft. Dabei wurden die Assoziationstesttest nach Sasieni [127] angewendet. Hierbei werden nicht nur die Allelfrequenzen sondern auch die einzelnen Genotypen auf ihre Häufigkeit mit einander verglichen. Zusätzlich wird ein Armitage Trend Test durchgeführt, der eine größere Teststärke besitzt und mit dem ein Trend in der Mutationshäufigkeit zwischen zwei Gruppen festgestellt werden kann.

Patienten vs. HGW-Kontrollen	Allelfrequenz [1--2]	heterozygot [11--12]	homozygot [11--22]	Allel positiv [11--12/22]	Armitage trend test
M1-SNP8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M2-SNP8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M3-SNP8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M4-SNP8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M-SNP8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G1-SNP8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G2-SNP8	n.s.	n.s.	Odds=49,6 C.I.=[1.83-1341.2] p=0,00009	n.s.	Odds=8,9 p=0,03887
G-SNP8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M1-SNP12	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M2-SNP12	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M3-SNP12	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M4-SNP12	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M-SNP12	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G1-SNP12	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G2-SNP12	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G-SNP12	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M1-SNP13	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M2-SNP13	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M3-SNP13	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M4-SNP13	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M-SNP13	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G1-SNP13	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G2-SNP13	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G-SNP13	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M1+2-SNP8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M1+2-SNP12	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M1+2-SNP13	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M3+4-SNP8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M3+4-SNP12	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M3+4-SNP13	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 17: Ergebnisse der Assoziationstests der Patientenkohorten gegen die Kontrollkohorte

Patienten vs. Patienten	Allelfrequenz [1--2]	heterozygot [11--12]	homozygot [11--22]	Allel positiv [11--12/22]	Armitage trend test
G1-G2-SNP8	Odds=17,3 C.I.=[1.67-179.41] p=0,02436	n.s.	Odds=17,3 C.I.=[0.63-472.6] p=0,02004	Odds=12,3 C.I.=[0.96-158.1] p=0,01986	Odds=33,9 p=0,01055
G1-G2-SNP12	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G1-G2-SNP13	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M3-M4-SNP8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M3-M4-SNP12	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M3-M4-SNP13	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G1+M3-G2+M4-SNP8	Odds=4,0 C.I.=[1.28-12.5] p=0,02380	n.s.	n.s.	Odds=3,7 C.I.=[1.081-12.543] p=0,02869	Odds=6,2 p=0,01514
G1+M3-G2+M4-SNP12	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G1+M3-G2+M4-SNP13	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab 18: Ergebnisse der Assoziationstests unterschiedlicher Patientenkohorten

Patienten vs. HGW-Kontrollen	Allelfrequenz [1--2]	heterozygot [11--12]	homozygot [11--22]	Allel positiv [11--12/22]	Armitage trend test
G+M	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G1	Odds=0,2 C.I.=[0.054-1.005] p=0,03436	Odds=0,2 C.I.=[0.048-0.937] p=0,02627	n.s.	Odds=0,2 C.I.=[0.048-0.937] p=0,02627	Odds=0,2 p=0,02627
G2	n.s.	n.s.	Odds =44,1 C.I.=[1.629-1192.348] p=0,00021	n.s.	n.s.
G	n.s.	Odds=0,3 C.I.=[0.078-0.949] p=0,03084	n.s.	n.s.	n.s.
M1+M2	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
M3+M4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 19: Ergebnisse der Assoziationstests der Patientenkohorten gegen die Kontrollkohorte unter Summation der einzelnen SNP.

Patienten vs. Patienten	Allelfrequenz [1--2]	heterozygot [11--12]	homozygot [11--22]	Allel positiv [11--12/22]	Armitage trend test
G1-G2	n.s.	n.s.	Odds =16,8 C.I.=[0.617-460.222] p=0,02175	n.s.	Odds =17,4 p=0,02696
M3-M4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G1+M3-G2+M4	Odds=2,4 C.I.=[0.982-5.631] p=0,04990	n.s.	n.s.	n.s.	Odds =3,6 p=0,04723

Tab 20: Ergebnisse der Assoziationstests unterschiedlicher Patientenkohorten unter Summation der einzelnen SNP.

Der Vergleich unterschiedlicher Kohorten ergibt mehrfach signifikante Werte. Bei der getrennten Auswertung der einzelnen SNP treten signifikante Werte mehrfach bei den Vergleichen der Verteilung der SNP8 Mutation auf. Hier zunächst beim Vergleich der in Greifswald im Krankheitsverlauf Verstorbenen mit der Kontrollgruppe (G2 vs. G). Hier ist der Armitage Trendtest signifikant und homozygote Mutationen kommen im Vergleich signifikant häufiger vor. Ebenso zeigt der Vergleich der beiden Greifswalder Patientengruppen (G1 vs. G2) mehrfach signifikante Unterschiede. Allelfrequenz, Homozygotie, Allel Positivität und Armitage Trendtest ergeben signifikante Ergebnisse. Auch beim zusammengefassten Vergleich der schweren Krankheitsverläufe beider Standorte (G1+M1 vs. G2+M2) ergeben sich signifikante Werte für Allelfrequenz, Allel Positivität und Armitage Trendtest. Bei den anderen beiden Mutationen (SNP12 und SNP 13) kommen keine signifikanten Ergebnisse zustande.

Werden alle Mutationen gemeinsam betrachtet so ergeben sich erneut signifikante Werte beim Vergleich der in Greifswald im Krankheitsverlauf Verstorbenen mit der Kontrollgruppe (G2 vs. G). Zwar ist der Armitage Trendtest nicht mehr positiv, aber homozygote Mutationen kommen immer noch signifikant häufiger vor. Zusätzlich bringt auch der Vergleich der Greifswalder Patienten die eine schwere Pankreatitis überlebt haben mit der Kontrollgruppe (G1 vs. G) statistisch signifikante Unterschiede. Auch beim Vergleich der Patientenkollektive untereinander kommt es mehrfach zu signifikanten Ergebnissen. So ist der Vergleich der beiden Greifswalder Gruppen statistisch signifikant bezüglich homozygoter Mutationen. Ebenso ist der Armitage Trendtest hier positiv. Wird der Vergleich erneut um die Magdeburger Gruppen ergänzt bleibt der positive Armitage Trendtest bestehen. Jetzt ist jedoch die Allelfrequenz und nicht mehr die homozygoten Mutationen signifikant unterschiedlich. Bei isolierter Betrachtung des Magdeburger Kollektivs konnte jedoch erneut keine Signifikanz nachgewiesen werden.

Im Einzelnen ergaben sich bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse folgende signifikanten Unterschiede: Die Homozygote SNP8 Mutation war bei den Greifswalder Patienten die im Verlauf der Pankreatitis gestorben sind signifikant häufiger als bei den Kontrollen. Das Quotenverhältnis (Odds ratio) liegt hier bei 49,6 ($p=0,00009$). Die Analyse mittels Armitage Trendtest liefert ebenfalls ein signifikantes Ergebnis (Odds ratio 8,9/ $p=0,03887$).

Dieser Test weist auf ein gesteigertes Risiko bei vorliegender schwerer Pankreatitis zu versterben für Patienten mit homozygoter Mutation im Vergleich zu Patienten mit heterozygoter Mutation hin. Da es sich um einen Trendtest mit ansteigendem Risiko handelt beinhaltet er hier, dass SNP8 heterozygot mutierte Patienten im Vergleich zu SNP8 Wildtyp

Patienten ein ebenfalls erhöhtes Risiko haben bei bereits eingetretener schwerer Pankreatitis im Verlauf zu versterben.

Deutliche signifikante Unterschiede kommen auch beim Vergleich der Greifswalder Patientengruppen zum Vorschein. Die Allelfrequenz von SNP8 ist hier signifikant unterschiedlich (Odds ratio 17,3/ $p=0,02436$). Die Homozygote SNP 8 Mutation kommt bei den Verstorbenen ebenfalls deutlich gehäuft vor (Odds ratio 17,3/ $p=0,02004$), das gleiche gilt für die Allelpositivität (Odds ratio 12,3/ $p=0,01986$). Somit bedeuten für die Greifswalder Patientengruppen Allelpositivität und Homozygotie bezüglich der SNP8 Mutation im Vergleich zum Wildtyp, ein mehr als 17-fach gesteigertes Risiko an einer schweren Pankreatitis zu versterben, wenn bereits ein schwerer Krankheitsverlauf eingetreten ist. Auch bei diesem Vergleich zeigt der Armitage Trendtest einen signifikanten Unterschied (Odds ratio 33,9/ $p=0,01055$).

Werden beide Untersuchungsstandorte gemeinsam analysiert sind ebenso Unterschiede nachzuweisen. Hierbei weisen Allelfrequenz (Odds ratio 4,0/ $p=0,02380$) und Allelpositivität (Odds ratio 3,7/ $p=0,02869$) sowie der Armitage Trendtest (Odds ratio 6,2/ $p=0,01514$) statistische Signifikanz auf.

Bei den ebenfalls untersuchten Mutationen von SNP12 und SNP13 kamen keine signifikanten Ergebnisse zustande.

Werden nun alle Mutationen nochmals gemeinsam analysiert kommen erneut zahlreiche statistisch signifikante Unterschiede zustande. Der Vergleich der Greifswalder Patienten die eine schwere Pankreatitis überlebt haben mit den Kontrollen ist bezüglich Allelfrequenz (Odds ratio 0,2/ $p=0,03436$), heterozygoter Mutationen (Odds ratio 0,2/ $p=0,02627$), Allelpositivität (Odds ratio 0,2/ $p=0,02627$) sowie im Armitage Trendtest (Odds ratio 0,2/ $p=0,02627$) signifikant. Hier kommen im Vergleich zu den Kontrollen jedoch weniger Mutationen vor. Wird die andere Greifswalder Patientengruppe mit den Kontrollen verglichen ergibt sich erneut ein signifikanter Unterschied bezüglich der homozygoten Mutationen (Odds44,1/ $p=0,00021$). Werden die Patientengruppen nun untereinander verglichen sind homozygote Mutationen (Odds ratio 16,8/ $p=0,02175$) und der Armitage Trendtest (Odds ratio 17,4/ $p=0,02696$) signifikant. Das Risiko an einer schweren Pankreatitis bei bereits eingetretenem schwerem Verlauf zu versterben war für homozygote Mutationsträger also etwa 17-fach erhöht. Auch heterozygote Mutationsträger hatten ein im Vergleich zu Patienten ohne Mutation erhöhtes Risiko, darauf weist der Armitage Trendtest hin. Werden nun die Greifswalder Patientengruppen um die entsprechenden Magdeburger Gruppen ergänzt zeigen sich weiterhin signifikante Unterschiede. Und zwar in der Allelfrequenz (Odds ratio 2,4/ $p=0,0499$) und beim Armitage Trendtest (Odds ratio 3,6/ $p=0,04723$).

Die signifikanten Ergebnisse bei der Analyse der Häufigkeit der SNP8 NOD2 Mutation geben deutliche Hinweise dass der von uns vermutete Zusammenhang zumindest bei dieser Mutation besteht. Dabei zeigt sich in unseren Ergebnissen, dass heterozygote Mutationen alleine betrachtet nicht als aggravierend für den Verlauf der Pankreatitis angesehen werden können. Allelpositivität und Allelfrequenz sind jedoch beim Vergleich der beiden von einer schweren Pankreatitis betroffenen Patientengruppen signifikant höher. Ebenso zeigt der Armitage Trendtest hier signifikante Ergebnisse.

Wenn homozygote Mutationen isoliert betrachtet werden, liefert nur der erste Vergleich (G1 - G2) sowie der Vergleich der in Greifswald an einer Pankreatitis Verstorbenen mit der Greifswalder Kontrollgruppe signifikante Ergebnisse. Diese können jedoch bei der gemeinsamen Analyse der unterschiedlichen Standorte (G1+M3 - G2+M4) nicht bestätigt werden. Ob eine homozygote SNP8 Mutation auf den Verlauf der Pankreatitis aggravierend wirkt, ist somit anhand unserer Daten nicht zu entscheiden.

7. Diskussion

7.1. Auswertung der Daten

Die Analyse der Daten erbrachte mehrfach statistisch signifikante Werte. Bei unseren Daten kommen Mutationen des SNP8 des NOD2 Gens gehäuft bei Patienten vor die im Verlauf einer schweren Pankreatitis erstorben sind. In den anderen Patientengruppen kam es nicht zu einer Häufung von Mutationen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Somit sind Mutationen des NOD2 Gens kein Risikofaktor für die Entstehung einer akuten Pankreatitis. Die Häufung der SNP8 Mutation bei Patienten die im Verlauf an einer schweren Pankreatitis verstorben sind weist daraufhin, dass bei bereits vorliegender schwerer Pankreatitis und vorhandener SNP8 Mutation das Risiko im weiteren Verlauf zu versterben erhöht ist. Patienten mit einer homozygoten Mutation haben hierfür ein 17-fach erhöhtes Risiko. Beim direkten Vergleich der beiden Greifswalder Patientengruppen waren die Allelfrequenzen bei den im Verlauf der Erkrankung verstorbenen Patienten signifikant höher. Der Armitage Trendtest war signifikant. Dieser Test weist auf ein höheres Risiko im Verlauf der Erkrankung zu versterben für Patienten mit homozygoter Mutation im Vergleich zu Patienten mit heterozygoter Mutation, sowie im Vergleich von heterozygoten Mutationsträgern mit Patienten ohne Mutation, hin. Der Assoziationstest bezüglich heterozygoter SNP8 Mutationen zwischen den Greifswalder Patientengruppen erbringt jedoch keine Signifikanz und kann somit die Ergebnisse der Armitage Trendtest nicht untermauern.

Diese Ergebnisse werden in weiten Teilen durch die Erweiterung der Testgruppen um die entsprechenden Magdeburger Kollektive unterstrichen. Zwar ist der Assoziationstest für homozygote Mutationsträger nicht signifikant, aber die Unterschiede in Allelfrequenz, bei Allelpositivität und der signifikante Armitage Trendtest bleiben bestehen. Im nunmehr Patienten-stärkeren Vergleich sind die Odds ratios zwar nicht mehr so hoch, dafür konnten die zuvor äußerst großen Konfidenzintervalle verengert werden. Besonders wesentlich ist, dass die Konfidenzintervalle nun nicht mehr die eins beinhalten. Bei immer noch großen Konfidenzintervallen ist in Zukunft jedoch einer Vergrößerung der Untersuchungsgruppe unerlässlich.

Die bereits beschriebenen signifikanten Unterschiede bei der zusammenfassenden Beobachtung der einzelnen Mutationen des NOD2 Gens ergeben ein ähnliches Bild wie bei isolierter Beobachtung der SNP 8 Mutation. Man kann somit vermuten, dass die Unterschiede hier aufgrund der enthaltenen Daten der SNP8 Mutation bestehen.

Anhand der Daten konnten wir also erstmals zeigen, dass es bei schweren Verläufen der Pankreatitis und vorhandener SNP8 Mutation des NOD2 Gens gehäuft zu Todesfällen kommt. Bei den von uns untersuchten Patienten war das Risiko bis zu 17-fach erhöht. Diese Beobachtung trifft jedoch nur auf die SNP8 Mutation zu. Somit liegt die Folgerung Nahe, dass es funktionelle Unterschiede zwischen den einzelnen Mutationen des NOD2 Gens gibt. Die Ergebnisse konnten jedoch nicht bei isolierter Betrachtung des Magdeburger Kollektivs (M3 - M4) untermauert werden. Zusätzlich weisen die breiten Konfidenzintervalle auf eine gewisse Unsicherheit hinsichtlich der Belastbarkeit der Daten hin. Es sind daher sicherlich weitere Studien mit größeren Fallzahlen zur Absicherung der Daten notwendig.

In unserer Studie wurden bei der statistischen Auswertung die Patientengruppen aus den verschiedenen Rekrutierungsgebieten nicht immer getrennt betrachtet. Dies kann bei genetischen Studien zu Problemen führen, da bei einem Vergleich von ethnisch oder geographisch unterschiedlichen Personengruppen, verschiedene Prävalenzen der untersuchten Allele bestehen können. So sind bei Studien in Europa unterschiedliche Häufigkeiten bei NOD2 Mutationen in der Normalbevölkerung gefunden worden [128, 129, 130]. Die verwendeten Studiengruppen stehen sich jedoch geographisch sehr nahe und die ethnischen Unterschiede dürften, auch wenn die Gruppen diesbezüglich nicht untersucht wurden, gering sein. Mit einer relevanten Störung der Untersuchungsergebnisse ist hierdurch nicht zu rechnen.

Die Patientenrekrutierung erfolgte an beiden Standorten nur nach relativ unscharfen Kriterien. So waren zwar an beiden Standorten Organversagen Bedingung für die Einteilung in die Gruppe der schweren Pankreatitisverläufe. In Greifswald erfolgte jedoch auch eine Zuteilung zu den schweren Verläufen bei nachgewiesenen Nekrosen im CT. Auch lag es im Ermessen der behandelnden Ärzte, einzuschätzen wann ein Organversagen vorlag. Der Einfluss auf die Studie hierdurch ist nur schwer abzuschätzen. Auch hier sind bei weiteren Studien genauere Einschlusskriterien erforderlich. Bei den Vergleichen, welche die signifikanten Ergebnisse erbrachten ist jedoch zumindest das Einteilungskriterium: im Behandlungsverlauf gestorben an beiden Standorten eindeutig.

Die statistisch signifikanten Ergebnisse, lassen sich gut über die erhöhte Todesrate durch infizierte Nekrosen [131] erklären. Sie untermauern den Verdacht, dass NOD2 Mutationen eine bakterielle Infektion des Pankreas begünstigen.

7.2. Möglichkeit der Assoziation zwischen NOD2 Mutationen und dem Verlauf der akuten Pankreatitis

Neben dem Zusammenhang von Mutationen des NOD2 Gens mit Morbus Crohn, konnten auch für andere Krankheitsbilder ein Zusammenhang mit NOD2 Gen Mutationen nachgewiesen werden. So gelten die Mutationen R334Q, R334W und L469F des NOD2 Gens als krankheitsauslösend für das Blau Syndrom [132], einer seltenen Erbkrankheit, die mit Arthritis, Iritis und Ausschlag einhergeht [133]. Sie liegen im NOD Bereich und nicht, wie die mit Morbus Crohn assoziierten Mutationen, im LRR Bereich des NOD2 Gens. Auch für die Graft-versus-Host Disease (GvHD) und Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation konnte eine Assoziation mit Mutationen des NOD2 Gens gezeigt werden [134]. Ebenso wurden zahlreiche andere Erkrankungen auf eine Assoziation mit NOD2 Mutationen untersucht [135].

Ein möglicher Zusammenhang von NOD2 Mutationen mit dem Verlauf der akuten Pankreatitis könnte auf eine ähnliche Weise zustande kommen, wie sie schon für den Zusammenhang zwischen NOD2 Mutationen und Morbus Crohn vermutet worden ist: Verminderte Produktion von α -Defensinen in Gegenwart von NOD2 Mutationen. Paneth Zellen sezernieren in Gegenwart von LPS und anderen bakteriellen Produkten α -Defensine und andere antimikrobielle Proteine [136]. Dies trägt wahrscheinlich zur Kontrolle der mikrobiellen Flora des Dünndarms bei [137]. Wenn nun, in Gegenwart von NOD2 Mutationen die Produktion von α -Defensinen eingeschränkt ist, kommt es in der Folge zu einer höheren und anders garteten Standortflora im Dünndarm [138]. Dies beeinträchtigt die Abwehrfunktion der Darmbarriere.

Ein weiterer möglicher Einflussweg von NOD2 auf die Abwehrfunktion der Darmbarriere, und somit eine eventuelle Rolle bei der akuten Pankreatitis, könnte in der Interaktion von NOD2 mit dem GRIM19 (gene associated with retinoid-IFN-induced mortality 19) Protein liegen. Das GRIM19 Protein hat Einfluss auf die Invasivität von Bakterien in intestinalen Epithel-Zellen [139]. Weder der genaue Mechanismus der Zusammenarbeit noch der Einfluss auf die NF κ B Aktivierung ist bisher bekannt.

Eine höhere Standortflora im Darm und eine gesteigerte Invasivität von Bakterien sind mögliche Ursachen, wieso bei einer primär sterilen Pankreatitis gehäuft bakterielle Infektionen des Pankreas eintreten könnten. In der Summe würden man in Gegenwart von NOD2 Mutationen gehäuft schwerere Pankreatitiden beobachten. Ob NOD2 Mutationen bereits zu Beginn einer Pankreatitis oder erst ab einem bestimmten Stadium der Erkrankung einen aggravierenden Effekt hätten, bleibt zunächst fraglich. Studien belegen, dass es im

Gegensatz zu sterilen Nekrosen, bei entzündeten Nekrosen gehäuft zu Organversagen [140] und Tod [131] kommt.

Ein weiterer Weg auf dem NOD2 Mutationen Einfluss auf den Verlauf der akuten Pankreatitis nehmen könnten, ist durch die verstärkte Aktivität pro-inflammatorischer Zytokine. Diese könnte durch den TLR2 Rezeptor, welcher durch ein mutiertes NOD2 Protein weniger gehemmt wird, zustande kommen. So wurde gezeigt, dass NOD2 knockout Mäuse, die mittels Lipopeptiden stimuliert wurden ein Ungleichgewicht in der TLR2 vermittelten Produktion von Zytokinen (weniger IL-10, mehr IL12) aufweisen [141,142]. Dieses Ungleichgewicht könnte ebenfalls im Verlauf der Pankreatitis Einfluss haben. Wie bereits zuvor beschrieben wurde für IL-10 eine schützende und für IL-12 eine schädigende Funktion für den Verlauf der Pankreatitis vermutet.

Viele Autoren gehen von einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion des Darms als Konsequenz der drei funktionsverlierenden Mutationen des NOD2 Gen aus. Somit ist ein Einfluss auf den Verlauf der Pankreatitis durch Begünstigung bakterieller Translokationen der zunächst steril verlaufenden Entzündung gut vorstellbar.

Das schnelle Erkennen von PAMPs als körperfremd und die nachfolgende Immunreaktion sind zentraler Bestandteil der angeborenen Immunität. Eine Störung dieser Funktion oder der nachfolgenden Reaktionen können somit weitreichende Konsequenzen für die Gesundheit eines Organismus haben. Es ist daher nicht überraschend, dass TLRs und NODs in letzter Zeit häufig Gegenstand der Forschung bei entzündlichen Erkrankungen sind. Insbesondere TLR4 ist im Zusammenhang mit dem Verlauf der akuten Pankreatitis untersucht worden. So stellten Saluja et al im Tierversuch einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von TLR4 und dem Ausmaß der akuten Pankreatitis fest. Es wurde gezeigt dass TLR4 knock-out Mäuse sowohl bei der Caerulin- wie auch bei der L-Arginin-induzierten Pankreatitis weniger Schaden nehmen [143]. Diese Ergebnisse konnten jedoch nicht auf die akute Pankreatitis des Menschen übertragen werden. Weiss et al konnten keinen Zusammenhang zwischen den häufigsten Polymorphismen, welche mit einem Funktionsverlust von TLR4 einhergehen (Asp299Gly und Thr300Ile) und der akuten Pankreatitis des Menschen feststellen [144]. Andererseits wurde in einer chinesischen Studie mit geringerer Patientenzahl beim Vergleich von Patienten, bei denen eine Pankreasnekrose mittels CT nachgewiesen wurde mit einer gesunden Kontrollgruppe ein gehäuftes Auftreten eines funktionseinschränkenden TLR4 Polymorphismus Asp299Gly beobachtet [145]. Eine weitere chinesische Studie konnte ebenfalls keinen Unterschied in der Häufigkeit des Asp299Gly Allels des TLR4 Gens beim Vergleich von Patienten mit mildem Verlauf einer

Pankreatitis mit Patienten mit schwerem Verlauf einer Pankreatitis sowie einer gesunden Kontrollgruppe feststellen. Hier wurde jedoch eine Häufung einer bestimmten Variante der Mannose bindenden Lektin Gens, welches das Mannose bindende Lektin, einem akute Phase Protein, kodiert, bei Patienten mit schwerem Verlauf einer akuten Pankreatitis im Vergleich zu Patienten mit mildem Verlauf beobachtet [146]. Es gibt also eine im Moment widersprüchliche Sachlage bezüglich der Bedeutung von TLR4 Mutationen für den Verlauf der akuten Pankreatitis.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun ein weiterer Mechanismus des angeborenen Immunsystems und seine Rolle bei der Pankreatitis untersucht. Wir stellten die Hypothese auf, dass die für Morbus Crohn relevanten NOD2 Mutationen auch einen Einfluss auf den Verlauf der akuten Pankreatitis haben.

7.3. Relevanz der Fragestellung

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob bestehende Mutationen des NOD2 Gens mit schwereren Verläufen der Pankreatitis assoziiert sind. Die milde Verlaufsform der Pankreatitis geht mit einer Mortalität von etwa einem Prozent einher, schwere Pankreatitiden dagegen mit einer Mortalität von zehn bis dreißig Prozent [147, 148]. Bei einem so deutlichen Unterschied ist eine Prognose zur Verlaufsvoraussage der Pankreatitis besonders wichtig. Hierdurch können Patienten, die von einer schweren Verlaufsform der Pankreatitis bedroht sind, möglichst intensiver Überwachung zugeführt und somit Komplikationen frühzeitig diagnostiziert und therapiert werden. Die vorhandenen Ressourcen könnten bei einer frühen und sichereren Prognose ökonomischer eingesetzt werden. Wenn diese Prognose auf klinische Untersuchungen allein beruht, gelingt eine korrekte Voraussage der Verlaufsform nur in 34-44 Prozent der Fälle [149, 150]. Daher wurden zahlreiche Prognosesysteme zur Verlaufseinschätzung entwickelt. Die CRP Wert Messung 48 Stunden nach Krankenhausaufnahme hat mit einer Sensitivität von 80 Prozent und einer Spezifität von 76 Prozent [151] einen hohen Stellenwert. Zusätzlich haben der BUN (Blood urea nitrogen) und der Procalcitoninwert einen gewissen Stellenwert. Als Prognosesystem haben sich vor allem der APACHE II Score, die Ranson Kriterien und der CT severity index durchgesetzt. Nachteilig ist, dass die meisten Scores erst nach 48 Stunden abgeschlossen sind, bzw. erst die Wertveränderung nach mehrmaliger Anwendung aussagekräftig ist. Trotzdem wurde bisher kein Prognosesystem oder Laborparameter zur Abschätzung des Verlaufs einer akuten Pankreatitis gefunden, welcher, allein genutzt, eine zufriedenstellende Vorhersageleistung erbringt [152]. Bei einem nachgewiesenen Zusammenhang zwischen Mutationen und dem Verlauf der akuten Pankreatitis könnten die bestehenden Prognosesysteme verbessert werden.

Sollte es gelingen, einen Zusammenhang zwischen NOD2 Mutationen und schwerwiegenden Verlaufsformen der Pankreatitis sicher nachzuweisen, könnten sich neue Ansätze zu möglichen Therapieformen der Pankreatitis ergeben. So könnte versucht werden, die in Gegenwart der NOD2 Mutationen verminderten α -Defensine zielgerecht zu substituieren, um schwere Verlaufsformen mit bakterieller Infektion des Pankreas zu verhindern. Beim Morbus Crohn, bei dem verminderte α -Defensin Spiegel ebenfalls als Krankheitsursache diskutiert werden [122], müsste eine mögliche Substitutionsbehandlung eher langfristig erfolgen. Dies würde Konsequenzen für die Zusammensetzung der Darmflora bedeuten die in ihrer Folge schwer abzusehen sind, da beim Morbus Crohn eine veränderte Darmflora ebenfalls als Krankheitsursache diskutiert wird [153]. Im Gegensatz hierzu könnte eine Anwendung im Verlauf der akuten Pankreatitis lediglich kurzfristig als Prophylaxe gegen Infektionen, die mit schweren Verläufen und erhöhter Mortalität assoziiert sind, erfolgen.

8. Zusammenfassung

Ein wichtiger Aspekt der Pankreatitisforschung ist neben der Aufklärung der Pathophysiologie das Erkennen von Prognosefaktoren, die eine Aussage über den Verlauf einer Pankreatitis zu einem möglichst frühen Zeitpunkt nach Beginn der Erkrankung ermöglichen. Dies ist insbesondere wichtig um solche Patienten zu identifizieren, die später einen schweren Krankheitsverlauf haben, Komplikationen entwickeln und daher möglichst frühzeitig einer intensiven Überwachung und Therapie zugeführt werden müssen. Eine frühe verlässliche Prognose würde es ermöglichen vorhandene Ressourcen möglichst nur dort einzusetzen, wo sie gebraucht werden.

Das Auftreten von Morbus Crohn ist mit Mutationen des NOD2 Gens assoziiert. NOD2 ist ein intrazellulärer Rezeptor zur Erkennung von krankheitsassoziierten bakteriellen Strukturen. NOD2 vermittelt die Induktion von α -Defensinen, antimikrobiellen Peptiden der Darmschleimhaut und ist somit mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung der Darmbarriere. Da die bakterielle Translokation auch im Rahmen einer akuten Pankreatitis eine lebensbedrohliche Komplikation darstellen kann wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob Mutationen des NOD2 Gens (R702W, G908R, 3020InsC) in Zusammenhang mit dem Verlauf der akuten Pankreatitis stehen. Dazu wurde die DNA von 192 Patienten mit leichtem oder schwerem Verlauf einer akuten Pankreatitis und 120 gesunden Kontrollprobanden, von den Universitätsstandorten Greifswald und Magdeburg analysiert. Das Auftreten der drei NOD2-Mutationen wurde mit Taqman-Analyse und anschließender genomischer Sequenzierung untersucht.

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse der Patienten aus Greifswald konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen dem Verlauf der schweren akuten Pankreatitis und der R708W Mutation des NOD2 Gens belegt werden. Für die Kohorte der Patienten aus Magdeburg war die Assoziation der NOD2-Mutationen jedoch nicht signifikant, so dass insgesamt eine eindeutige Aussage bezüglich der Fragestellung nicht abschließend getroffen werden konnte. Die vorliegende Studie deutet darauf hin, dass NOD2-Mutationen als Risikofaktor bei einem schweren Pankreatitisverlauf für deren letalen Ausgang anzusehen sind. Um die Rolle der NOD2-Mutationen endgültig zu klären sollten jedoch weitere Studien mit größeren Patientenzahlen durchgeführt werden.

9. Literaturverzeichnis

1. Greenberger NJ, Toskes PP Harrison's Innere Medizin 2 15. Auflage Seite 1970
2. Frey CF, et al
The incidence and case-fatality rates of acute biliary, alcoholic, and idiopathic pancreatitis in California, 1994-2001.
Pancreas. 2006 Nov;33(4):336-44.
3. Jaakkola, M. and I. Nordback, Pancreatitis in Finland between 1970 and 1989. Gut, 1993. 34(9): p. 1255-60.
4. Shaddique S, Cahill RA, Watson RG, O'Connor J. Trends in the incidence and significance of presentations to the emergency department due to acute pancreatitis. Eur J Emerg Med. 2006 Aug;13(4):209-13.
5. Lankisch, P.G. and P.A. Banks, Pancreatitis. 1997, Berlin-Heidelberg-New York: Springer.
6. Wilson, C. and C.W. Imrie, Changing patterns of incidence and mortality from acute pancreatitis in Scotland, 1961-1985. Br J Surg, 1990. 77(7): p. 731-4.
7. Deng X, Wang L, Elm MS, Gabazadeh D, Diorio GJ, Eagon PK, Whitcomb DC. Chronic alcohol consumption accelerates fibrosis in response to cerulein-induced pancreatitis in rats. Am J Pathol. 2005 Jan;166(1):93-106.
8. Gukovskaya AS, Mouria M, Gukovsky I, Reyes CN, Kasho VN, Faller LD, Pandol SJ. Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. Gastroenterology. 2002 Jan;122(1):106-18.
9. Haber PS, Apte MV, Moran C, Applegate TL, Pirola RC, Korsten MA, McCaughan GW, Wilson JS. Non-oxidative metabolism of ethanol by rat pancreatic acini. Pancreatology. 2004;4(2):82-9. Epub 2004 Mar 30.
10. Werner J, Laposata M, Fernandez-del Castillo C, Saghir M, Iozzo RV, Lewandrowski KB, Warshaw AL. Pancreatic injury in rats induced by fatty acid ethyl ester, a nonoxidative

metabolite of alcohol. *Gastroenterology*. 1997 Jul;113(1):286-94.

11. Criddle DN, Raraty MG, Neoptolemos JP, Tepikin AV, Petersen OH, Sutton R. Ethanol toxicity in pancreatic acinar cells: mediation by nonoxidative fatty acid metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 20;101(29):10738-43. Epub 2004 Jul 9.
12. Kruger B, Albrecht E, Lerch MM. The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis. *Am J Pathol*. 2000 Jul;157(1):43-50.
13. Raraty M, Ward J, Erdemli G, Vaillant C, Neoptolemos JP, Sutton R, Petersen OH. Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 21;97(24):13126-31.
14. Miyasaka K, Ohta M, Takano S, Hayashi H, Higuchi S, Maruyama K, Tando Y, Nakamura T, Takata Y, Funakoshi A. Carboxylester lipase gene polymorphism as a risk of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas*. 2005 May;30(4):e87-91.
15. Papachristou GI, Papachristou DJ, Morinville VD, Slivka A, Whitcomb DC. Chronic alcohol consumption is a major risk factor for pancreatic necrosis in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol*. 2006 Nov;101(11):2605-10. Epub 2006 Oct 4.
16. Wang YL, Hu R, Lugea A, Gukovsky I, Smoot D, Gukovskaya AS, Pandol SJ. Ethanol feeding alters death signaling in the pancreas. *Pancreas*. 2006 May;32(4):351-9.
17. Mareninova OA, Sung KF, Hong P, Lugea A, Pandol SJ, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Cell death in pancreatitis: caspases protect from necrotizing pancreatitis. *J Biol Chem*. 2006 Feb 10;281(6):3370-81. Epub 2005 Dec 8.
18. Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbueger M, Reinheckel T, Domschke W, Lippert H, Peters C, Deussing J. Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest*. 2000 Sep;106(6):773-81
19. Omary MB, Lugea A, Lowe AW, Pandol SJ. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest*. 2007 Jan;117(1):50-9.
20. Apte MV, Pirola RC, Wilson JS. Battle-scarred pancreas: role of alcohol and pancreatic

- stellate cells in pancreatic fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Oct;21 Suppl 3:S97-S101.
21. Acosta JM, Ledesma CL. Gallstone migration as a cause of acute pancreatitis. *N Engl J Med*. 1974 Feb 28;290(9):484-7.
22. E.L. Opie, The etiology of acute hemorrhagic pancreatitis. *Bull Johns Hopkins Hosp* 12 (1901), pp. 182–185.
23. Lerch MM, Saluja AK, Runzi M, Dawra R, Saluja M, Steer ML. Pancreatic duct obstruction triggers acute necrotizing pancreatitis in the opossum. *Gastroenterology*. 1993 Mar;104(3):853-61.
24. Runzi M, Layer P. Etiology, pathogenesis and pathophysiology of acute pancreatitis *Schweiz Med Wochenschr*. 1997 May 17;127(20):849-53.
25. Brandwein SL, Sigman KM. Case report: milk-alkali syndrome and pancreatitis. *Am J Med Sci*. 1994 Sep;308(3):173-6.
26. Raraty M, Ward J, Erdemli G, Vaillant C, Neoptolemos JP, Sutton R, Petersen OH. Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Nov 21;97(24):13126-31.
27. Mithofer K, Fernandez-del Castillo C, Frick TW, Lewandrowski KB, Rattner DW, Warshaw AL. Acute hypercalcemia causes acute pancreatitis and ectopic trypsinogen activation in the rat. *Gastroenterology*. 1995 Jul;109(1):239-46.
28. Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Amann ST, Toskes PP, Liddle R, McGrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet*. 1996 Oct;14(2):141-5.
29. Witt H, Luck W, Hennies HC, Classen M, Kage A, Lass U, Landt O, Becker M. Mutations in the gene encoding the serine protease inhibitor, Kazal type 1 are associated with chronic pancreatitis. *Nat Genet*. 2000 Jun;25(2):213-6.
30. Sahin-Toth M, Graf L, Toth M. Trypsinogen stabilization by mutation Arg117-->His: a unifying pathomechanism for hereditary pancreatitis? *Biochem Biophys Res Commun*. 1999

Oct 22;264(2):505-8.

31. Kukor Z, Tóth M, Pál G, et al. Human cationic trypsinogen. Arg(117) is the reactive site of an inhibitory surface loop that controls spontaneous zymogen activation. *J Biol Chem.* 2002;277:6111–6117

32. Sahin-Tóth M, Tóth M. Gain-of-function mutations associated with hereditary pancreatitis enhance autoactivation of human cationic trypsinogen. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;278:286–289.

33. Nathan JD, Romac J, Peng RY, Peyton M, Macdonald RJ, Liddle RA. Transgenic expression of pancreatic secretory trypsin inhibitor-I ameliorates secretagogue-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology.* 2005;128:717–727.

34. Teich, N, Bauer, N, Mossner, J, Keim, V. Mutational screening of patients with nonalcoholic chronic pancreatitis: Identification of further trypsinogen variants. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:341.

35. <http://www.uni-leipzig.de/pancreasmutation/db.html>

36. Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med.* 1998;339:653–658

37. Sharer N, Schwarz M, Malone G, et al.. Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *N Engl J Med.* 1998;339:645–652.

38. Witt H, Sahin-Toth M, Landt O, Chen JM, Kahne T, Drenth JP, Kukor Z, Szepessy E, Halangk W, Dahm S, Rohde K, Schulz HU, Le Marechal C, Akar N, Ammann RW, Truninger K, Bargetzi M, Bhatia E, Castellani C, Cavestro GM, Cerny M, Destro-Bisol G, Spedini G, Eiberg H, Jansen JB, Koudova M, Rausova E, Macek M Jr, Malats N, Real FX, Menzel HJ, Moral P, Galavotti R, Pignatti PF, Rickards O, Spicak J, Zarnescu NO, Bock W, Gress TM, Friess H, Ockenga J, Schmidt H, Pfutzer R, Lohr M, Simon P, Weiss FU, Lerch MM, Teich N, Keim V, Berg T, Wiedenmann B, Luck W, Groneberg DA, Becker M, Keil T, Kage A, Bernardova J, Braun M, Guldner C, Halangk J, Rosendahl J, Witt U, Treiber M, Nickel R, Ferec C. A degradation-sensitive anionic trypsinogen (PRSS2) variant protects against chronic pancreatitis. *Nat Genet.* 2006 Jun;38(6):668-73. Epub 2006 May 14.

39. Figarella C, Mischczuk-Jamska B, Barret AJ: Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens: Activation of both human trypsinogens by cathepsin B and spontaneous acid activation of human trypsinogen. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1988;369:293-298
40. Gorelick FS, Otani T: Mechanisms of intracellular zymogen activation. *Baillière's Clin Gastroenterol* 1999;13:227-240.
41. The role of calcium in pancreatitis. Niederau C, Luthen R, Klonowski-Stumpe H, Schreiber R, Soika I, Sata N, Bing H, Haussinger D. *Hepatogastroenterology*. 1999 Sep-Oct;46(29):2723-30. Review.
42. Frank Ulrich Weiss, Walter Halangk, Markus M Lerch (2008) New advances in pancreatic cell physiology and pathophysiology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 22: 1. 3-15
43. VOGETSEDER W, TILG H Update - Akute Pankreatitis *Journal für Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankungen* 2004; 2 (4), 19-23
44. Pathogenesis of acute pancreatitis. Steer ML. *Digestion*. 1997;58 Suppl 1:46-9. Review.
45. Bhatia M: Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *Am J Physiol* 2004;286:G189-G196.
46. Gukovskaya AS, Perkins P, Zaninovic V, Sandoval D, Rutherford R, Fitzsimmons T, Pandol SJ, Poucell-Hatton S: Mechanisms of cell death after pancreatic duct obstruction in the opossum and the rat. *Gastroenterology* 1996;110:875-884
47. Hahm KB, Kim JH, You BM, Kim YS, Cho SW, Yim H, Ahn BO, Kim WB: Induction of apoptosis with an extract of *Artemisia asiatica* attenuates the severity of cerulein-induced pancreatitis in rats. *Pancreas* 1998;17:153-157
48. Bhatia M: Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002;1:343-351.
49. Gukovskaya AS, Gukovsky I, Zaninovic V, Song M, Sandoval D, Gukovsky S, Pandol SJ: Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis. *J Clin Invest* 1997;100:1853-1862.

50. Rinderknecht H: Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation? *Int J Pancreatol* 1988;3:105-112.
51. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47: 921–8.
52. Baldwin AS. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649–83.
53. Chen, F; Castranova, V; Shi, X; Demers, LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem.* 1999;45:7–17.
54. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336: 1066–71.
55. Virlos I, Mazzon E, Serraino I, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate reduces the severity of cerulein-induced murine acute pancreatitis. *Shock* 2003; 20: 544–50.
56. Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, et al. Localized pancreatic NF-kappaB activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G1197–208.
57. Steinle AU, Weidenbach H, Wagner M: NF-kappaB/Rel activation in cerulean pancreatitis. *Gastroenterology* 1999;116:420-430
58. Chen X, Ji B, Han B, Ernst SA, Simeone D, Logsdon CD: NF-kappaB activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response. *Gastroenterology* 2002;122:448-457
59. Uhl W, Warshaw A, Imrie C, Bassi C, McKay CJ, Lankisch PG, Carter R, Di Magno E, Banks PA, Whitcomb DC, Dervenis C, Ulrich CD, Satake K, Ghaneh P, Hartwig W, Werner J, McEntee G, Neoptolemos JP, Buchler MW, International Association of Pancreatology: IAP Guidelines for the Surgical Management of Acute Pancreatitis. *Pancreatol* 2002;2:565-573

60. Denham W, Yang J, Fink G: Gene targeting demonstrates additive detrimental effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor during pancreatitis. *Gastroenterology* 1997;113:1741-1746
61. Hughes CB, Grewal HP, Gaber LW, Kotb M, El-din AB, Mann L, Gaber AO: Anti-TNFalpha therapy improves survival and ameliorates the pathophysiologic sequelae in acute pancreatitis in the rat. *Am J Surg* 1996;171:274-280
62. Suzuki S, Miyasaka K, Jimi A, Funakoshi A: Induction of acute pancreatitis by cerulein in human IL-6 gene transgenic mice. *Pancreas* 2000;21:86-92.
63. Shimada M, Andoh A, Hata K, Tasaki K, Araki Y, Fujiyama Y, Bamba T: IL-6 secretion by human pancreatic periacinar myofibroblasts in response to inflammatory mediators. *J Immunol* 2002;168:861-868
64. Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Stachura J, Tomaszewska R, Konturek SJ, Sendur R, Dembinski M, Pawlik WW: Pancreatic damage and regeneration in the course of ischemia-reperfusion induced pancreatitis in rats. *J Physiol Pharmacol* 2001;52:221-235
65. Rongione AJ, Kusske AM, Kwan K, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW: Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 1997;112:960-967
66. Osman MO, Jacobsen NO, Kristensen JU, Deleuran B, Gesser B, Larsen CG, Jensen SL: IT 9302, a synthetic interleukin-10 agonist, diminishes acute lung injury in rabbits with acute necrotizing pancreatitis. *Surgery* 1998;124:584-592.
67. Pizzelli R, Billi P, Miniero R, Barakat B: Serum interleukin-10 in human acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1997;42:2469-247
68. Chen CC, Wang SS, Lu RH, Chang FY, Lee SD: Serum interleukin 10 and interleukin 11 in patients with acute pancreatitis. *Gut* 1999;45:895-899
69. Wereszczynska-Siemiakowska U, Dabrowski A, Siemiakowski A, Mroczo B, Laszewicz W, Gabryelewicz A: Serum profiles of E-selectin, interleukin-10, and interleukin-6 and oxidative stress parameters in patients with acute pancreatitis and nonpancreatic acute abdominal pain. *Pancreas* 2003;26:144-152.
70. Zhou W, Levine BA, Olson MS: Platelet activating factor: A mediator of pancreatic

inflammation during cerulein stimulation. *Am J Pathol* 1993;142:1504-1512

71. Kingsnorth AN, Galloway SW, Formela LJ: Randomized double-blind phase II trial of lexipafant, a platelet factor antagonist, in human acute pancreatitis. *Br J Surg* 1995;82:1414-1420

72. Johnson CD, Kingsnorth AN, Imrie CW, McMahon MJ, Neoptolemos JP, McKay C, Toh SK, Skaife P, Leeder PC, Wilson P, Larvin M, Curtis LD: Double blind, randomised, placebo controlled study of a platelet activating factor antagonist, lexipafant, in the treatment and prevention of organ failure in predicted severe acute pancreatitis. *Gut* 2001;48:62-69.

73. McKay CJ: Recent developments in the management of acute pancreatitis. *Dig Surg* 2002;19:129-134

74. Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J: Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 2000;190:117-125

75. Frossard JL, Saluja A, Lee HS, Bhatia M, Steer ML: The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* 1999;116:694-701.

76. Lundberg AH, Fukatsu K, Gaber L, Callicutt S, Kotb M, Wilcox H, Kudsk K, Gaber AO: Blocking pulmonary ICAM-1 expression ameliorates lung injury in established diet-induced pancreatitis. *Ann Surg* 2001;233:213-220.

77. Brady M, Bhatia M, Christmas S, Boyd MT, Neoptolemos JP, Slavin J: Expression of the chemokines MCP-1/JE and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in early acute pancreatitis. *Pancreas* 2002;25:260-269

78. Bhatia M, Brady M, Zagorski J: Treatment with neutralising antibody against cytokine induced neutrophil chemoattractant (CINC) protects rats against acute pancreatitis associated lung injury. *Gut* 2000;47:838-844

79. Bhatia M, Saluja AK, Hofbauer B, Frossard JL, Lee HS, Castagliuolo I, Wang CC, Gerard N, Pothoulakis C, Steer ML: Role of substance P and the neurokinin 1 receptor in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4760-4765.

80. Bradley, EL., 3rd; A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, , September 11 through 13, 1992. *Arch Surg* 1993. ;128:586–90.
81. Severe sepsis and Toll-like receptors. Gao H, Leaver SK, Burke-Gaffney A, Finney SJ. *Semin Immunopathol.* 2008 Feb;30(1):29-40. Epub 2007 Dec 11. Review
82. Acute pancreatitis - from cellular signalling to complicated clinical course. Andersson R, Andersson B, Andersson E, Axelsson J, Eckerwall G, Tingstedt B. *HPB (Oxford).* 2007;9(6):414-20.
83. Beger HG, Bittner R, Block S, et al. Bacterial contamination of pancreatic necrosis—a prospective clinical study. *Gastroenterology* 1986; 91:433–8.
84. Bradley III, EL Allen K. A prospective longitudinal study of observation versus surgical intervention in the management of necrotizing pancreatitis. *Am J Surg* 1991; 161:19–24.
85. Gloor B, Muller CA, Worni M, et al. Pancreatic infection in severe pancreatitis: the role of fungus and multiresistant organisms. *Arch Surg* 2001; 136:592–6.
86. Luiten EJ, Hop WC, Endtz HP, et al. Prognostic importance of gram-negative intestinal colonization preceding pancreatic infection in severe acute pancreatitis. Results of a controlled clinical trial of selective decontamination. *Intensive Care Med* 1998; 24:438–45.
87. Ammori BJ, Leeder PC, King RFGJ, et al. Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis: correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality. *J Gastrointest Surg* 1999; 3:252–62.
88. Morrison DC, Ryan JL. Bacterial endotoxins and host immune responses. *Adv Immunol* 1979; 28:293–450.
89. Territo MC, Golde DW. Granulocyte function in experimental human endotoxemia. *Blood* 1976; 47:539–44.
90. Richardson RP, Rhyne CD, Fong Y, et al. Peripheral blood leukocyte kinetics following in vivo lipopolysaccharide (LPS) administration to normal human subjects. *Ann Surg* 1989; 210:239–45.
91. Liehr H, Grun M, Thiel H, et al. Endotoxin-induced liver necrosis and intravascular

coagulation in rats enhanced by portacaval collateral circulation. *Gut* 1975; 16:429–36.

92. Ranson JH. Etiological and prognostic factors in human acute pancreatitis: a review. *Am J Gastroenterol* 1982; 77(9):633-8.

93. Blamey SL, Imrie CW, O'Neill J, Gilmour WH, Carter DC. Prognostic factors in acute pancreatitis. *Gut*. 1984 Dec;25(12):1340-6.

94. Knaus WA, Zimmerman JE, Wagner DP, Draper EA, Lawrence DE. APACHE-acute physiology and chronic health evaluation: a physiologically based classification system. *Crit Care Med*. 1981 Aug;9(8):591-7.

95. Balthazar EJ, Robinson DL, Megibow AJ, Ranson JH. Acute pancreatitis: value of CT in establishing prognosis. *Radiology*. 1990 Feb;174(2):331-6.

96. Leung TK, Lee CM, Lin SY, Chen HC, Wang HJ, Shen LK, Chen YY. Balthazar computed tomography severity index is superior to Ranson criteria and APACHE II scoring system in predicting acute pancreatitis outcome. *World J Gastroenterol*. 2005 Oct 14;11(38):6049-52.

97. Bradley EL 3rd. A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the International Symposium on Acute Pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. *Arch Surg*. 1993 May;128(5):586-90. Review.

98. Mayerle J, et al. Therapie der akuten Pankreatitis 746 *Med Klin* 2003;98:744–9 (Nr. 12)

99. Petrov MS, Kukosh MV, Emelyanov NV. A Randomized Controlled Trial of Enteral versus Parenteral Feeding in Patients with Predicted Severe Acute Pancreatitis Shows a Significant Reduction in Mortality and in Infected Pancreatic Complications with Total Enteral Nutrition. *Dig Surg*. 2006 Dec 12;23(5-6):336-345

100. Windsor AC, Kanwar S, Li AG, Barnes E, Guthrie JA, Spark JI, Welsh F, Guillou PJ, Reynolds JV. Compared with parenteral nutrition, enteral feeding attenuates the acute phase response and improves disease severity in acute pancreatitis. *Gut*. 1998 Mar;42(3):431-5.

101. Kalfarentzos F, Kehagias J, Mead N, Kokkinis K, Gogos CA. Enteral nutrition is superior to parenteral nutrition in severe acute pancreatitis: results of a randomized prospective trial.

Br J Surg. 1997 Dec;84(12):1665-9.

102. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 2001;7:167–202.

103. Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest*. 2006 Jan;86(1):9-22. Review.

104. O'Neill LA, Fitzgerald KA, Bowie AG. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol*. 2003 Jun;24(6):286-90.

105. Medzhitov R, Janeway C Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol*. 2000 Oct;8(10):452-6. Review.

106. Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, et al. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* 2003;52:840–6.

107. Ogura Y, Lala S, Xin W, et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 2003;52:1591–7.

108. Rosenstiel, P. et al. TNF- α and IFN- γ regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 124, 1001–1009 (2003).

109. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003;278:8869–72.

110. Vavricka SR, Musch MW, Chang JE, Nakagawa Y, Phanvijhitsiri K, Waypa TS, Merlin D, Schneewind O, Chang EB. hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology*. 2004 Nov;127(5):1401-9

111. Viala J, Chaput C, Boneca IG, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* 2004;5:1166–74.

112. Bertin J, Nir WJ, Fischer CM, Tayber OV, Errada PR, Grant JR, Keilty JJ, Gosselin ML, Robison KE, Wong GH, Glucksmann MA, DiStefano PS (1999) Human CARD4 protein is a

novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 274: 12955–12958

113. Abbott DW, Wilkins A, Asara JM, et al. The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitylation of a novel site on NEMO. *Curr Biol* 2004;14:2217–27

114. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):599-603.

115. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):603-6.

116. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*. 2001 Jun 16;357(9272):1925-8.

117. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 2003;3:371–82.

118. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005;307:731–4

119. Ogura Y, Lala S, Xin W, et al. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 2003;52:1591–7.

120. Lala S, Ogura Y, Osborne C, et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 2003;125:47–57

121. Henckaerts L, Vermeire S. NOD2/CARD15 disease associations other than Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007 Feb;13(2):235-41. Review.

122. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004;53:1658–64
123. Kramer M, Netea MG, de Jong DJ, Kullberg BJ, Adema GJ. Impaired dendritic cell function in Crohn's disease patients with NOD2 3020insC mutation. *J Leukoc Biol* 2006; **79**: 860–866
124. NOD2 and defensins: translating innate to adaptive immunity in Crohn's disease. Peyrin-Biroulet L, Chamaillard M. *J Endotoxin Res.* 2007;13(3):135-9.
125. Maeda S, Hsu L, Liu H, et al. Nod 2 mutation in Crohn's disease potentiates NF- κ B activity and IL-1 β processing. *Science* 2005; 307:734–738.
126. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol.* 2004 Aug;5(8):800-8
127. Sasieni PD (1997):From genotypes to genes: Doubling the sample size. *Biometrics*, Band 53, 1253–1261
128. Vind I, Vieira A, Hougs L, Tavares L, Riis L, Andersen PS, Loch H, Freitas J, Monteiro E, Christensen IJ, Munkholm P. NOD2/CARD15 gene polymorphisms in Crohn's disease: a genotype-phenotype analysis in Danish and Portuguese patients and controls. *Digestion.* 2005;72(2-3):156-63. Epub 2005 Sep 19.
129. Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, Fennell J, Smith BR, MacKinlay E, Morecroft J, Anderson N, Kelleher D, O'Sullivan M, McManus R, Satsangi J. NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun.* 2004 Aug;5(5):417-25.
130. Helio T, Halme L, Lappalainen M, Fodstad H, Paavola-Sakki P, Turunen U, Farkkila M, Krusius T, Kontula K. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut.* 2003 Apr;52(4):558-62.
131. Dervenis C, Johnson CD, Bassi C, Bradley E, Imrie CW, McMahon MJ, Modlin I.

Diagnosis, objective assessment of severity, and management of acute pancreatitis. Santorini consensus conference. *Int J Pancreatol.* 1999 Jun;25(3):195-210. Review.

132. Mitchell JA, Paul-Clark MJ, Clarke GW, McMaster SK, Cartwright N. Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. *J Endocrinol.* 2007 Jun;193(3):323-30. Review.

133. Blau EB. Familial granulomatous arthritis, iritis, and rash. *J Pediatr.* 1985 Nov;107(5):689-93.

134. Holler E, Rogler G, Herfarth H, Brenmoehl J, Wild PJ, Hahn J, Eissner G, Scholmerich J, Andreesen R. Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2004 Aug 1;104(3):889-94. Epub 2004 Apr 15.

135. Henckaerts L, Vermeire S. NOD2/CARD15 disease associations other than Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2007 Feb;13(2):235-41. Review.

136. Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, et al. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 2000;1:113–18.

137. Elphick DA, Mahida YR.
Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease.
Gut. 2005 Dec;54(12):1802-9. Review

138. Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. Petnicki-Ocwieja T, Hrcir T, Liu YJ, Biswas A, Hudcovic T, Tlaskalova-Hogenova H, Kobayashi KS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Sep 15;106(37):15813-8. Epub 2009 Sep 1.

139. Barnich N, Hisamatsu T, Aguirre JE, Xavier R, Reinecker HC, Podolsky DK. GRIM-19 interacts with nucleotide oligomerization domain 2 and serves as downstream effector of anti-bacterial function in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2005 May 13;280(19):19021-6. Epub 2005 Mar 7.

140. Isenmann R, Rau B, Beger HG. Bacterial infection and extent of necrosis are determinants of organ failure in patients with acute necrotizing pancreatitis. *Br J Surg.* 1999 Aug;86(8):1020-4.

141. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, et al. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* 2004;5:800–8
142. Netea MG, Kullberg BJ, de Jong DJ, et al. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur J Immunol* 2004;34:2052–9.
143. R Sharif, R Dawra, K Wasiluk, P Phillips, V Dudeja, E Kurt-Jones, R Finberg and A Saluja Impact of toll-like receptor 4 on the severity of acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury in mice 2009;58;813-819 *Gut*
144. Toll-like receptor 4 polymorphisms in German and US patients with severe acute pancreatitis
145. Hong-Kai Gao, MD, Zong-Guang Zhou, MD, PhD, Yuan Li, MD, and You-Qin Chen, PhD Toll-Like Receptor 4 Asp299Gly Polymorphism Is Associated With an Increased Risk of Pancreatic Necrotic Infection in Acute Pancreatitis A Study in the Chinese Population *Pancreas* 2007;34:295Y298
146. TLR and MBL gene polymorphisms in severe acute pancreatitis. Zhang D, Zheng H, Zhou Y, Yu B, Li J. *Mol Diagn Ther.* 2008;12(1):45-50.
147. Carroll JK, Herrick B, Gipson T, Lee SP. Acute pancreatitis: diagnosis, prognosis, and treatment. *Am Fam Physician.* 2007 May 15;75(10):1513-20. Review
148. Triester SL, Kowdley KV. Prognostic factors in acute pancreatitis. *J Clin Gastroenterol.* 2002 Feb;34(2):167-76. Review.
149. Corfield AP, Cooper MJ, Williamson RC, Mayer AD, McMahon MJ, Dickson AP, Shearer MG, Imrie CW. Prediction of severity in acute pancreatitis: prospective comparison of three prognostic indices. *Lancet.* 1985 Aug 24;2(8452):403-7.
150. Larvin M, McMahon MJ. APACHE-II score for assessment and monitoring of acute pancreatitis. *Lancet.* 1989 Jul 22;2(8656):201-5
151. Larvin M. Assessment of clinical severity and prognosis. In: *The Pancreas*, Beger HG, Warshaw AL, Buchler MW, et al (Eds), Blackwell Science, Oxford 1998. p.489.

152. Robert JH, Frossard JL, Mermillod B, Soravia C, Mensi N, Roth M, Rohner A, Hadengue A, Morel P. Early prediction of acute pancreatitis: prospective study comparing computed tomography scans, Ranson, Glasgow, Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II scores, and various serum markers. *World J Surg.* 2002 May;26(5):612-9. Epub 2002 Mar 1.

153. Tamboli, C. P., C. Neut, P. Desreumaux, and J. F. Colombel. 2004. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 53:1-4.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

02.09.2011

Unterschrift

Curriculum vitae

Angaben zur Person:

Name: Richard Bartels
Wohnort: Rossbachstrasse 17/1
88212 Ravensburg
Geboren am: 28.10.1978 in Wiesbaden
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1985 – 1989 Grundschule Robert Schuhmann-Schule Wiesbaden
1989 – 1998 Dilthey-Gymnasium Wiesbaden
Schulabschluss: Allg. Hochschulreife

Praktika:

10/1998 – 04/1999 Pflegepraktikum Asklepios Paulinen Klinik, Wiesbaden
5/1999 – 11/1999 R+V Versicherung AG Wiesbaden, Personalentwicklung
(Durchführung und Auswertung von Bewerbungstest)
12/1999 – 05/2000 ASB Rettungsdienst Wiesbaden, Ausbildung zum
Rettungshelfer
06/2000 – 08/2000 RUF Jugendreisen, Jugendreisebetreuung im
Europäischen Ausland

Studium:

seit 2000 Studium der Humanmedizin an der Ernst-Moritz Arndt Universität
Greifswald
Sommer 2002: Physikum
Sommer 2003: Erstes Staatsexamen
Sommer 2005: Zweites Staatsexamen

10/2005 – 04/2006 Urlaubsemester zum Abschluss des praktischen Teils der
Promotion

- 04/2006 Beginn des Praktischen Jahres
1. Tertial: Innere Medizin
 - Departement Innere Medizin, Kantonspital St. Gallen, Schweiz
 - 1. Teil: Onkologie (Prof. Dr. Cerny)
 - 2. Teil: Gastroenterologie (Prof. Dr. Meyenberger)
 2. Tertial: Chirurgie
 - 1. Teil: Seth G.S. Medical College & King Edward VII Memorial Hospital, Maharashtra University of Health Sciences, Mumbai, Indien (Prof. Dr. Hardikar)
 - 2. Teil: Kreiskrankenhaus Demmin, Lehrkrankenhaus der EMAU Greifswald (CA Dr. Wilhelm)
 3. Tertial: Anästhesie
 - Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin EMAU Greifswald (Prof. Dr. Wendt)

05/2007 Drittes Staatsexamen

Beruflicher Werdegang:

Von 10/2007 bis 12/2009 Assistenzarzt in der Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Oberschwabenklinik Krankenhaus St.

Elisabeth (Prof. Dr. Jehle)

Seit 01/2010 Assistenzarzt in der Abteilung für Unfallchirurgie und Orthopädie der Oberschwabenklinik Krankenhaus St. Elisabeth (Prof. Dr. Maurer)

Ravensburg, den 02.09.2011

Danksagung:

Bei Herrn Prof. Dr. med. Markus M. Lerch möchte ich mich für die Möglichkeit in seinem Institut zu promovieren bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Frank Ulrich Weiss für die außergewöhnliche Geduld, die hervorragende Anleitung und stets gute Unterstützung.

Ebenso danke ich Herrn Dr. med. Peter Simon, Frau Prof. Dr. med. Julia Mayerle, Herrn Dr. rer. nat. Manuel Ruthenbürger und Herrn Dr. Markus Grube für die Unterstützung.

Für die Bereitstellung der Patientenproben aus Magdeburg, sowie für die Bereitstellung der Kontrollproben möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Hans-Ulrich Schulz sowie bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Greinacher bedanken.

Für die tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit bedanke ich mich bei Doris Jordan und Ursula Raasch.

Für die kritische Durchsicht meiner Arbeit möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Bernd Heinrich herzlich bedanken.

Für die Unterstützung und den Antrieb in antriebsloser Zeit und möchte ich mich bei meiner Frau Judith und meiner Familie, besonders bei meiner Schwester Frau Dr. jur. Anna Quast, bedanken.